

UNTERSUCHUNGEN ZUR EVOLUTION RIBOSOMALER PROTEINE
VON ARCHAEBAKTERIEN

Gerhard Schmid

Diss
München
1984

UNTERSUCHUNGEN ZUR EVOLUTION RIBOSOMALER PROTEINE
VON ARCHAEBAKTERIEN

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Gerhard Schmid
aus
Thanstein

April 1984

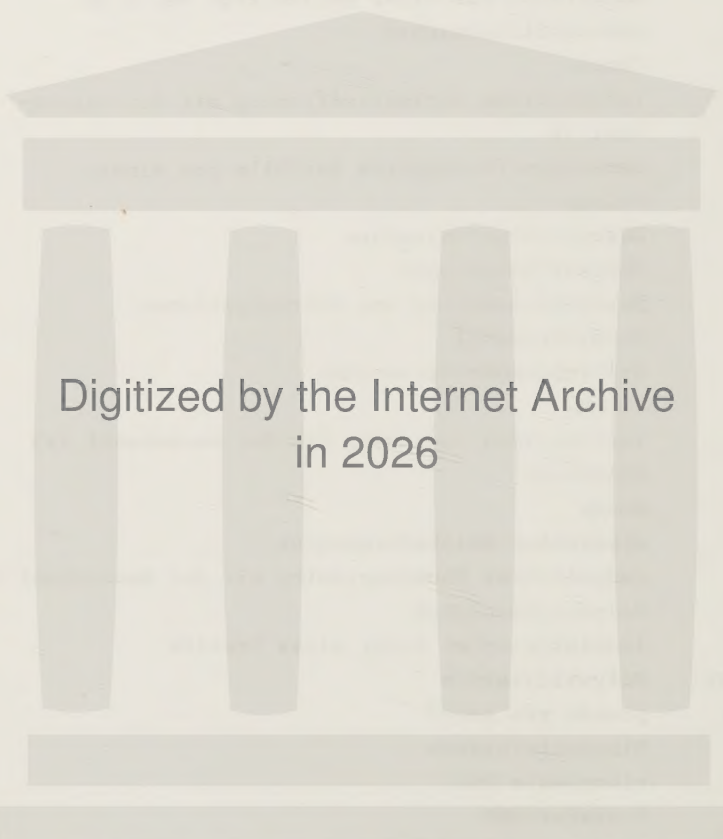
1. Gutachter: Prof. Dr. A. Böck

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Linzen

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 1984

Abkürzungen

A_x	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
ATP	Adenosintriphosphat
Ci	Curie
^{14}C	radioaktives Kohlenstoffisotop mit der Massenzahl 14
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro Minute
D	Dalton
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
h	Stunde
^{125}I	radioaktives Jodisotop mit der Massenzahl 125
kb	Kilobasen
M	molar
M_R	apparentes Molekulargewicht
^{32}P	radioaktives Phosphorisotop mit der Massenzahl 32
PEG	Polyäthylenglykol
pK_i	isoelektrischer Punkt eines Peptids
Poly(U)	Polyuridylsäure
p.s.i.	pounds pro inch ²
RNS	Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale RNS
tRNS	Transfer-RNS
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Svedberg-Einheit
^{35}S	radioaktives Schwefelisotop mit der Massenzahl 35
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TP	Totalprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UE	Untereinheiten



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	8
1. Verwendete Organismen	8
2. Medien	10
3. Anzuchtbedingungen	12
4. Aufbewahren von Kulturen	13
5. Präparation von Ribosomen, ribosomalen Untereinheiten und ribosomalen Proteinen	14
a) <i>Methanogene Bakterien</i>	14
b) " <i>Schwefelabhängige</i> " <i>Archaeobakterien</i>	15
c) <i>Halophile Bakterien</i>	16
d) <u><i>Saccharomyces cerevisiae</i></u>	16
e) <i>Eubakterien</i>	16
f) <i>Präparation ribosomaler Proteine</i>	16
6. Elektrophorese-Methoden	17
a) <i>Eindimensionale SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese</i>	17
b) <i>Zweidimensionale Polyacrylamid- Gelelektrophoresen zur Auftrennung ribosomaler Proteine</i>	17
c) <i>Auftrennung von Gesamtzellprotein nach O'Farrell</i>	18
d) <i>Reelektrophorese ribosomaler Proteine aus zweidimensionalen Gelen</i>	18
7. Spaltung von ribosomalen Proteinen mit Cyanbromid	18

8. Test auf Phosphorylierung ribosomaler Proteine	19
9. In vivo Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in Zellprotein methanogener Bakterien	19
10. Immunologische Methoden	20
a) Präparation von Antiseren gegen ribosomale Proteine	20
b) Herstellung von Rohseren und Isolierung der Immunglobulin-Fraktion	20
c) Anreicherung der IgG-Antikörper	20
d) Immundoppeldiffusion	21
e) Immunoblotting	21
f) Abtrennung spezifischer Immunglobuline - Kontrollserum	22
11. Genetische Methoden	23
a) Präparation von λ -DNS	23
b) Plasmidisolierungen	23
c) Agarosegelelektrophorese	23
d) Isolierung von DNS-Fragmenten aus dem Agarosegel	23
e) Klonierung	24
f) Transformation	24
g) Radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten	24
h) Hybridisierung mit heterologer, radioaktiv markierter DNS-Probe	24
12. Besondere Chemikalien und Bezugsquellen	25
C. ERGEBNISSE	26
I. Proteinzusammensetzung archaebakterieller Ribosomen	26

1. Elektrophoretische Charakterisierung ribosomaler Proteine methanogener Bakterien	26
a) Zur Isolierung von ribosomalen Untereinheiten	26
b) Molekulargewichtsbereich der ribosomalen Proteine	28
c) Zweidimensionale Auftrennung ribosomaler Proteine	30
2. Elektrophoretische Charakterisierung ribosomaler Proteine von "schwefelabhängigen" Archaeobakterien	36
a) Isolierung ribosomaler Untereinheiten von <u>Sulfolobus</u>	36
b) Isolierung ribosomaler Untereinheiten von <u>Thermoproteus tenax</u> , <u>Desulfurococcus mobilis</u> und <u>Thermococcus celer</u>	37
c) Molekulargewichtsverteilung der ribosomalen Proteine	37
d) Bestimmung der Anzahl der ribosomalen Proteine mit zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
3. Untersuchungen zur Individualität der in zweidimensionalen Elektropherogrammen identifizierten ribosomalen Proteine	46
4. Untersuchungen zur Acidität ribosomaler Proteine von methanogenen Bakterien	49
II. Immunologischer Vergleich ribosomaler Proteine von Archaeobakterien mit Hilfe der Immunoblotting-Methode	51
1. Sensitivität und Spezifität der Methode	51

2. Immunochemische Evidenzen für konservierte ribosomale Proteine von Archaeobakterien	56
3. Analyse der Konservativität ribosomaler Proteine von Prokaryonten und einem Eukaryonten mit Anti-70S-Seren	60
4. Untersuchungen mit einem monospezifischen Antiserum gegen das ribosomale Protein L2 von <u>E. coli</u>	64
a) Konservativität des ribosomalen Proteins L2	64
b) Identifizierung des L2-homologen ribosomalen Proteins in eindimensionalen und zweidimensionalen Elektropherogrammen	66
c) Versuche zur Quantifizierung des Homologiebereiches der L2-äquivalenten Proteine	68
5. Untersuchungen mit anderen monospezifischen Antiseren gegen ribosomale Proteine von <u>E. coli</u>	69
III. Versuche zur Isolierung eines ribosomalen Proteingens von <u>Mc. vannielii</u>	72
1. Untersuchung der Homologie zwischen dem Gen für das L2-Protein von <u>E. coli</u> und dem entsprechenden ribosomalen Proteingen von <u>Mc. vannielii</u>	72
2. Erstellen einer Koloniebanc von <u>Mc. vannielii</u>	74
D. DISKUSSION	77
E. ZUSAMMENFASSUNG	89
F. LITERATURVERZEICHNIS	92

A. EINLEITUNG

"Die Evolution der Translation ist der Schlüssel zur Lösung des Problems, die Entstehung der lebenden Systeme auf der Erde zu erklären."

Dies schrieb Carl R. Woese im Jahre 1980, drei Jahre nachdem von ihm ein Reich der Archaeobakterien postuliert worden war (Woese und Fox, 1977). Akzeptierte man bis dahin die Vorstellung, das Leben sei zweigeteilt in Prokaryonten und Eukaryonten, so konnte C. R. Woese aufgrund von Sequenzvergleichen von Oligonukleotiden der ribosomalen 16S RNS diese Dichotomie der Entwicklungslinien revidieren und ein eigenständiges drittes Reich der Archaeobakterien fordern (Fox et al., 1977b; Woese und Fox, 1977; Woese et al., 1978; Fox et al., 1980).

Die Grundlage für die neue phylogenetische Klassifikation war die Erkenntnis, daß Aminosäuresequenz oder Nukleotidsequenz von Makromolekülen molekulare Chronometer darstellen (Zuckerlandl und Pauling, 1965). Sequenzen von Makromolekülen ermöglichen es, die Phylogenie der Organismen auf genotypischer Ebene zu studieren, während die Taxonomie bisher hauptsächlich auf phänotypischen Merkmalen beruhte. Gleicher Phänotyp kann jedoch infolge konvergenter Entwicklung durch unterschiedliche Gensequenzen erzeugt werden.

Ideale Makromoleküle müssen zwei Bedingungen erfüllen:

- (i) Sie müssen universell sein;
- (ii) die Funktion muß während der Evolution konstant geblieben sein.

Beide Bedingungen erfüllen Komponenten des Translationsapparates. C. R. Woese wählte 16S rRNS für seine Untersuchungen

aus, da bekannt war, daß diese Ribonukleinsäure hoch konserviert in ihrer Sequenz ist, und der Informationsgehalt ausreicht, um sehr tiefe phylogenetische Verzweigungen erkennen zu können (Sogin et al., 1972; Fox et al., 1980; Woese, 1982).

Sequenzvergleiche von Oligonukleotiden der 16S rRNS vieler Vertreter der Prokaryonten führten zu dem eingangs erwähnten Ergebnis, daß das Reich der Prokaryonten phylogenetisch nicht kohärent ist, sondern in mindestens zwei Reiche aufgetrennt werden muß, in das der Eubakterien und der Archaeobakterien. Verwandtschaftlich stehen nach diesen Untersuchungen die Archaeobakterien gleich weit entfernt von Eubakterien und Eukaryonten (Fox et al., 1980).

Die Archaeobakterien zeichnen sich neben einer unterschiedlichen 16S rRNS-Sequenz durch folgende Charakteristika aus:

1. Sie besitzen keine mureinhaltigen Zellwandstrukturen (Kandler, 1979). Der Zellwandaufbau ist heterogen. Es dominiert die Proteinzellwand, die aus Glykoprotein aufgebaut ist (Mescher und Strominger, 1976; Taylor et al., 1982). Außerdem kommen Peptidoglykan-ähnliche Strukturen, wie Pseudomurein (König und Kandler, 1979), und auch Zellwände mit sulphatierten Heteropolysacchariden vor (Steber et al., 1975).
2. Archaeobakterien fehlen typische "Fettsäureglyzerinester-Lipide". Stattdessen bestehen die Lipide aus Glyzerin mit Isoprenoidseitenketten, die über eine Ätherbindung verknüpft sind (Langworthy, 1977; Tornebene und Langworthy, 1979; Langworthy et al., 1982).
3. Archaeobakterielle tRNS enthält kein Ribothymidin im sogenannten "T Ψ C-Loop" (Gupta und Woese, 1980). tRNS und rRNS unterliegen einer Archaeobakterien spezifischen Modifizierung (Woese et al., 1978).

4. Die Quartärstruktur der DNS-abhängigen RNS-Polymerase von Archaeobakterien ähnelt derjenigen der eukaryontischen RNS-Polymerase I. Rifampicin und Streptolydigin, Inhibitoren der eubakteriellen RNS-Polymerase, hemmen archaeobakterielle RNS-Polymerase nicht. Auch α -Amanitin, ein Inhibitor der eukaryontischen RNS-Polymerase II und III, wirkt nicht, während Silybin stimuliert wie bei der eukaryontischen RNS-Polymerase I (Zillig et al., 1978; Sturm et al., 1980; Zillig et al., 1982). Immunologische Untersuchungen bestätigen die strukturelle Homologie zwischen archaeobakterieller und eukaryontischer RNS-Polymerase I (Huet et al., 1983).
5. Sekundärstrukturen der 5S RNS von Archaeobakterien weichen von akzeptierten eubakteriellen und eukaryontischen cytoplasmatischen 5S Strukturmodellen ab. Archaeobakterielle Sekundärstrukturen zeigen eubakterielle, eukaryontische und auch einzigartige Merkmale (Fox et al., 1982).
6. Die Antibiotikasensitivität des Translationsapparates von Archaeobakterien ist nicht einheitlich. "Schwefelabhängige" (bisher thermoacidophile) Archaeobakterien sind insensitive gegen sehr viele eubakterielle und eukaryontische Inhibitoren der Translation (A. Böck, persönliche Mitteilung). Ribosomen von methanogenen und halophilen Archaeobakterien besitzen Wirkorte sowohl für einige 70S Inhibitoren - wie zum Beispiel Thiostrepton und Virginiamycin - als auch für 80S Inhibitoren - wie zum Beispiel für Anisomycin und Diphtherie-Toxin - (Elhardt und Böck, 1982; Kessel und Klink, 1981). Auffällig ist die Insensitivität der Archaeobakterien für den 70S und 80S Inhibitor Tetracyclin (Elhardt und Böck, 1982).
7. Die Organisation der Gene für ribosomale RNS ist eubakteriell in der Reihenfolge der Gene 16S-23S-5S, jedoch

wurde für mehrere Spezies ein zusätzliches 5S Gen gefunden, das - wie bei Eukaryonten - abgetrennt von den rRNS-Operonen liegt (Jarsch et al., 1983; Neumann et al., 1983).

Sequenzanalysen der Spacerregion zwischen dem Gen für 16S rRNS und 23S rRNS sowie des "Extra-5S-Gens" von Methanococcus vanniellii zeigen, (i) daß in einem von zwei untersuchten RNS-Operon wie bei Eubakterien ein tRNS^{Ala}-Gen vorhanden ist (Jarsch und Böck, 1983), (ii) daß dieses "Extra-5S-Gen" in einem Operon mit 7 tRNS-Genen organisiert ist (Wich et al., unveröffentlicht).

8. Bei Sulfolobus solfataricus wurden zum ersten Mal bei Prokaryonten tRNS-Gene mit Introns entdeckt (Kaine et al., 1983)
9. Die erste Gesamtsequenz einer archaebakteriellen 16S rRNS wurde kürzlich veröffentlicht (Gupta et al., 1983). Ein Vergleich mit eubakteriellen und eukaryontischen 16S (18S) rRNS-Gesamtsequenzen bestätigt die Ergebnisse, die durch Sequenzanalyse der T1-Oligonukleotide erhalten wurden. In Regionen mit ähnlicher 16S rRNS Sekundärstruktur besitzt das Archaebakterium Halobacterium (Hb.) volcanii mit Escherichia (E.) coli 63 %, Hb. volcanii mit Dictyostelium (Ds.) discoideum 56 % und E. coli mit Ds. discoideum 53 % Sequenzhomologie (Woese et al., 1983). Die archaebakterielle 16S rRNS Sequenz ist der eubakteriellen und eukaryontischen Sequenz ähnlicher als die beiden letztgenannten untereinander. Dies würde darauf hindeuten, daß die Archaebakteriensequenz der 16S rRNS des gemeinsamen Vorfahren von Eubakterien und Eukaryonten ähnlicher ist.

Die Heterogenität der genannten Eigenschaften innerhalb der Archaebakterien wie Antibiotikasensitivität, Zellwand, Struktur der RNS-Polymerase, 5S Sekundärstrukturen kennzeichnen

die Archaeobakterien als phylogenetisch tief gespaltene Gruppe. Derzeit existieren zwei Methoden, um die Phylogenie der Archaeobakterien in Dendrogrammen darzustellen. Die wohl genauere Methode beruht auf den T1-Oligonukleotidkatalogen der 16S rRNS. Durch Bildung eines Ähnlichkeitskoeffizienten (S_{AB} -Wert, siehe Fox et al., 1977) zwischen den Oligonukleotidkatalogen der Organismen läßt sich ein Dendrogramm erstellen. Die zweite Methode basiert auf der Temperaturstabilität von heterologen RNS-DNS Hybriden (Tu et al., 1982).

Da beide Methoden ähnliche Ergebnisse liefern, aber mit der zweiten Methode mehrere neue Isolate untersucht wurden, sind in Abbildung 1 die phylogenetischen Verwandtschaften der Archaeobakterien, die nach der zweiten Methode ermittelt wurden, in Form eines Dendrogramms dargestellt.

Die tiefste Verzweigung trennt die Archaeobakterien in zwei Gruppen, in die methanogenen/halophilen Gruppe und in die Gruppe der "schwefelabhängigen" Archaeobakterien. Die beiden Äste verzweigen sich mehrfach in tief gespaltene Ordnungen.

Das Dendrogramm veranschaulicht, daß sich Komponenten des Translationsapparates vorzüglich eignen, um phylogenetische Untersuchungen durchzuführen. Auch Untersuchungen an ribosomalen Proteinen (r-Proteinen) von Eubakterien und Eukaryonten haben dies bestätigt (Geisser et al., 1973 a,b; Matheson et al., 1980; Otaka et al., 1982; Wool, 1979). Die Anzahl der ribosomalen Proteine ist ein grundlegender Unterschied zwischen eubakteriellem und eukaryontischem Translationsapparat. Findet man am 70S Ribosom zwischen 50 und 55 ribosomale Proteine, davon 20 bis 21 Proteine an der 30S Untereinheit und 30 bis 34 Proteine an der 50S Untereinheit (Wittmann, 1982), so besitzen 80S Ribosomen 70 bis 80 ribosomale Proteine (ca. 30 aus 40S und ca. 45 aus 60S; Wool, 1979).

Die vorhandenen Aminosäuresequenzen von ribosomalen Proteinen lassen bisher nur spärliche Homologien zwischen Eubakterien

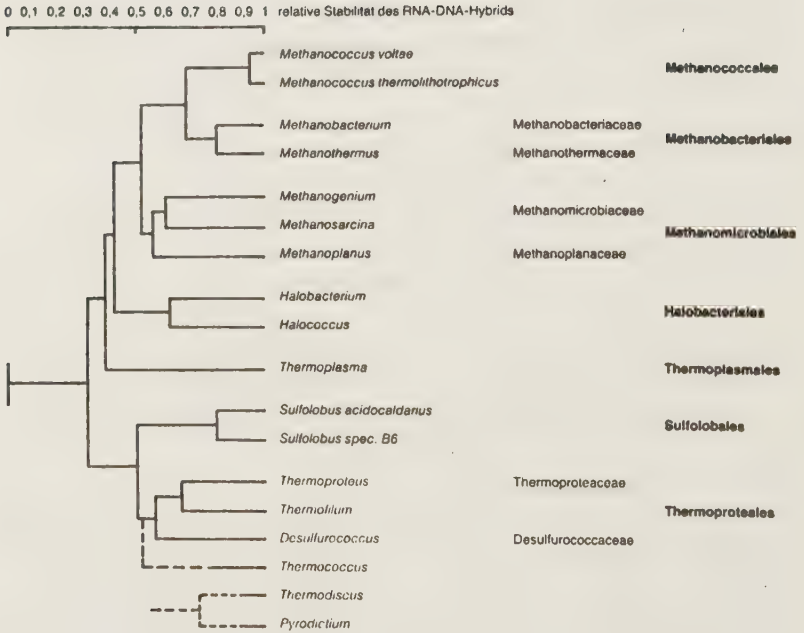


Abbildung 1:

Dendrogramm der Archaeobakterien, abgeleitet aus der Stabilität radioaktiv markierter 16S rRNS und DNS von Archaeobakterien (nach Tu et al., 1982)

und Eukaryonten erkennen. Dagegen sind innerhalb der Eubakterien auch bei phylogenetisch entfernten Organismen wie zum Beispiel zwischen E. coli und Mais Chloroplasten Sequenzhomologien einzelner ribosomaler Proteine (40 % bis 50 %) vorhanden (Subramanian et al., 1983).

Bei Archaeobakterien war zu Beginn der vorliegenden Arbeit die Proteinkomponente der Ribosomen kaum untersucht. Lediglich ribosomale Proteine von Halobacterium cutirubrum wurden eingehender charakterisiert. Für die 30S Untereinheit wurden 21 Proteine, für die 50S Untereinheit 32 Proteine beschrieben (Strøm und Visentin, 1973).

Das Außergewöhnliche an diesen ribosomalen Proteinen war die hohe Acidität (pK_i um 3.9), während ribosomale Proteine von Eubakterien und auch Eukaryonten mit wenigen Ausnahmen stark basischen Charakter besitzen (Strøm et al., 1975).

Von einem ribosomalen Protein, das auch als "A"-Protein bezeichnet wird, und bei E. coli den "L7/L12-stalk" bildet (siehe Abb. 32), wurden N-terminale Aminosäuresequenzen von Halobacterium cutirubrum und Methanobacterium thermoautotrophicum hergestellt. Beide Sequenzen zeigen zueinander 56 % Homologie. Mit "A"-Proteinen von Eubakterien kann 15 % bis 20 %, mit dem entsprechenden ribosomalen Protein von Saccharomyces cerevisiae kann 39 % Sequenzhomologie festgestellt werden (Matheson et al., 1980). Diese Ergebnisse stützen das neue phylogenetische Konzept und demonstrieren, daß auch Studien an ribosomalen Proteinen evolutionäre Aussagen erlauben.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, ribosomale Proteine von Repräsentanten der phylogenetischen Einheiten des methanogenen/halophilen und des "schwefelabhängigen" Zweiges der Archaeobakterien zu charakterisieren.

Gelelektrophoretische, immunologische und genetische Analysen sollten einen Beitrag zum Verständnis der Evolution der ribosomalen Proteine und der Organismen leisten.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Verwendete Organismen

Die verwendeten Organismen und ihre Herkunft sind in Tabelle 1 aufgelistet. Für die Stämme von Escherichia coli ist auch der Genotyp angegeben.

Tabelle 1: Organismen und ihre Herkunft

Organismen	Herkunft
a) <u>Archaeobakterien</u>	
<i>Methanobacterium</i> (Mb.) <i>bryantii</i> , M.o.H.	DSM 863
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> , ΔH	DSM 1053
<i>Methanobacterium formicum</i>	DSM 1312
<i>Methanobrevibacter</i> (Mbr.) <i>arboriphilus</i>	DSM 1125
<i>Methanococcus</i> (Mc.) <i>vannielii</i>	DSM 1224
<i>Methanospirillum</i> (Msp.) <i>hungatei</i>	DSM 864
<i>Methanosarcina</i> (Ms.) <i>barkeri</i>	DSM 1232
<i>Halobacterium</i> (Hb.) <i>halobium</i>	DSM 670
<i>Sulfolobus</i> (S.) <i>solfataricus</i> , P1 (DSM 1616)	W. Zillig, Martinsried
<i>Sulfolobus solfataricus</i> , N1	W. Zillig, Martinsried
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	DSM 639
<i>Sulfolobus brierleyi</i> (DSM 1651)	Zellen erhalten von W. Zillig
<i>Thermococcus</i> (Tc.) <i>celer</i> (DSM 2476)	Zellen erhalten von W. Zillig
<i>Desulfurococcus</i> (D.) <i>mobilis</i> (DSM 2161)	Zellen erhalten von W. Zillig
<i>Thermoproteus</i> (Th.) <i>tenax</i> , Kra 1 (DSM 2078)	Zellen erhalten von W. Zillig
<i>Thermoproteus neutrophilus</i>	Zellen erhalten von W. Zillig
<i>Thermoproteus</i> H3	Zellen erhalten von W. Zillig
AN I (nicht identifiziertes Isolat aus Neuseeland)	Zellen erhalten von W. Zillig
<i>Thermoplasma</i> (T.) <i>acidophilum</i> (DSM 1728)	Zellen erhalten von W. Zillig

Tabelle 1 - Fortsetzung

Organismen	Genotyp	Herkunft/Referenz
<u>b) Eubakterien</u>		
<i>Streptococcus</i> (Sc.) <i>faecalis</i>		Laborstamm
<i>Streptomyces</i> (St.) <i>griseus</i>		Ribosomales Protein, erhalten von W.Piendl, München
<i>Clostridium</i> (C.) <i>butyricum</i>		DSM 552
<i>Pseudomonas</i> (Ps.) <i>aeruginosa</i>		Laborstamm
<i>Rhodopseudomonas</i> (Rps.) <i>sphaeroides</i>		Laborstamm
<i>Escherichia</i> (E.) <i>coli</i> Stämme:		
<i>E. coli</i> K12 HB101	<i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , <i>recA13</i> , <i>supE44</i> , <i>lacZ4</i> , <i>leuB6</i> , <i>proA2</i> , <i>thi-1</i> , <i>StrA^R</i>	Davies et al. (1980)
<i>E. coli</i> NO1380	<i>F⁻</i> , <i>trkA401</i> <i>kdpABC5</i> , <i>lac</i> , <i>gal</i> , <i>Spc^R</i> , <i>StrA^R</i> , <i>Fus^R</i> , (λ <i>fus-3</i>), (<i>cI857 S7 b515 b519</i> <i>xis6</i>)	M. Nomura, Madison/ Wisconsin
<u>c) Eukaryonten</u>		
<i>Saccharomyces</i> (Sacch.) <i>cerevisiae</i> A 3641		80S Ribosomen, er- halten von W.Stöcklein, München
<i>Podospora</i> (P.) <i>anserina</i>		TP80 erhalten von Picard-Bennoun, Paris
Ratte (<i>Rattus rattus</i>)		Ribosomales Protein aus der Leber; er- halten von G.Stöffler, Berlin
Huhn (<i>Gallus gallus</i>)		Ribosomales Protein aus der Leber; er- halten von J.Gorden, Basel

2. Medien

Anzuchten der methanogenen Bakterien wurden, mit Ausnahme von Mc. vannielii, in den Medien nach Douglas et al. (1980) vorgenommen. Das für Methanococcus verwendete setzt sich folgendermaßen zusammen (Angaben pro l):

KH_2PO_4	0.5	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.4	g
NaCl	18	g
NH_4Cl	0.4	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.05	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.002	g
Hefeextrakt (Oxoid)	1.0	g
Bacto-Casitone (Difco)	2.0	g
Natriumacetat	1.0	g
Spurenelementlösung SL 6	6	ml
(DSM Katalog 1977, S. 240)		
Vitaminlösung nach Wolin et al. (1963)	10	ml
NaHCO_3	5	g
NiCl_2	0.0012	g
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.00035	g
Resazurin	0.001	g
Ampicillin	0.1	g
Na_2S	0.5	g
Cysteinhydrochlorid	0.5	g

Vor Zugabe von Ampicillin, Natriumsulfid und Cystein wurde der pH auf 7.7 eingestellt, das Medium begast und auto-kaviert; bebrütet wurde unter einer Gasatmosphäre von 80 % $\text{H}_2/20 \text{ } \text{CO}_2$ bei 37°C.

Bei Anzucht von Mc. vannielii auf Formiat als Energiequelle wurde das Medium mit 20 g/l Natriumformiat supplementiert. Die Gasatmosphäre setzte sich aus 80 % $\text{N}_2/20 \text{ } \text{CO}_2$ zusammen. Das Medium für die Anzucht von Mc. vannielii auf Agarplatten war mit obigem Medium identisch bis auf Zugabe von sterilem MOPS (N-Morpholinopropansulfonsäure) pH 6.8 auf eine End-

konzentration von 100 mM und von 2 % Agar.

Radioaktive Markierungen von Mc. vanniellii erfolgten in dem Medium nach Ferry und Wolfe (1977) (Angaben pro l):

KH_2PO_4	0.2	g
K_2HPO_4	0.2	g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	g
NaCl	0.4	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.08	g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.006	g
NaCO_3	4	g
Resazurin	0.001	g
SL 6	3	ml
Vitaminlösung	10	ml
NiCl_2	0.001	g
"Methionine Assay Medium" (Difco)	1	g
Cysteinhydrochlorid	0.25	g
Na_2S	2.5	g
1 M Imidazol/HCl pH 6.8	20	ml

Der pH wurde vor Zugabe von Natriumsulfid, Cystein und Imidazol auf einen Wert von 7.2 eingestellt.

Halobacterium wurde auf folgendem Medium angezogen (Angaben pro l):

Bacto-Pepton	10	g
NaCl	250	g
MgSO_4	20	g
KCl	2	g
Natriumcitrat	3	g
L-Arginin	1	g

Der pH-Wert wurde auf 6.8 eingestellt. Arginin wurde nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

Sulfolobus wurde in dem von Brock et al. (1972) beschriebenen Medium kultiviert.

Eubakterien - außer E. coli - wurden in TYGE Medium angezogen (Angaben pro l):

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Glucose	2 g

Für die Anzucht von E. coli wurde das Luria-Bertoni Medium verwendet (Angaben pro l):

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g

Für die Herstellung von festen Nährmedien wurden dem Medium 1.5 % Agar zugesetzt.

3. Anzuchtbedingungen

Methanogene Bakterien wurden in Serumflaschen (Macherey/ Nagel) oder Hungate-Tubes (Bellco Glass Inc.) angezogen. Die Herstellung der anaeroben Medien erfolgte nach einer vereinfachten Technik von Balch und Wolfe (1976). So wurden 20 ml beziehungsweise 5 ml der vorgenannten Medien - ohne Ampicillin, Cysteinhydrochlorid und Na_2S - in Serumflaschen beziehungsweise Hungate-Tubes eingefüllt, gasdicht verschlossen und an einer Gasstation dreimal evakuiert und mit dem entsprechenden Gasgemisch begast. Bei der letzten Begasung wurden die Serumflaschen unter 1 bar Überdruck gesetzt. Daraufhin wurden die Gefäße autoklaviert. Erst kurz vor Inoculation wurde Ampicillin zugegeben und die Medien mit Cysteinhydrochlorid und Na_2S reduziert. Anaerobe Großanzuchten erfolgten in einem 10 l Fermenter Biostat (Fa. Braun Melsungen). Für die Anzucht von Mc. vannielii auf Agarplatten wurden Serumflaschen mit 100 ml Agar-Medium gefüllt, begast und autoklaviert. Darauf wurde 1.5 M sterile MOPS-Pufferlösung

bis zu einer Endkonzentration von 100 mM mittels einer Spritze zugegeben, reduziert und falls notwendig, auch Antibiotika zugegeben. Das Gießen der Platten erfolgte in der Anaerobenkammer (Coy Instruments) unter einer Gasatmosphäre von 95 % N_2 /5 % H_2 . Die Platten konnten sofort verwendet werden, da die Zellen von McV, gemischt mit flüssigem Softagar (Endvolumen 2.5 ml, 45°C), auf die Platten aufpolymerisiert wurden. Die Inkubation erfolgte in Stahl-Anaerobentöpfen unter 80 % H_2 /20 % CO_2 Atmosphäre in Gegenwart von etwa 10 g Palladiumkatalysator bei 1 bar und 37°C.

Sulfolobus wurde aerob in 25 l Kautex-Behältern in einem Glycerinbad bei 75°C angezogen. Bei Erreichen der stationären Wachstumsphase wurde die Kultur mit Tris-Base auf pH 5.5 titriert. Erst danach wurde die Belüftung abgestellt und die Zellen unter Eiskühlung mit einer Durchlaufzentrifuge (Westphalia) geerntet. Dieses Vorgehen beim Ernten der Zellen sollte eine Ansäuerung des Cytoplasmas unter Nichtwachstumsbedingungen verhindern.

Flüssigkulturen von Halobakterien und aeroben Eubakterien wurden in Erlenmeyerkolben in einem Wasserbadschüttler (New-Brunswick, Modell G 76) bei 37°C bebrütet. Das Wachstum wurde in einem Hitachi 100-20 Spektrophotometer durch Messung der Zunahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 420 nm (A_{420}) verfolgt. Großanzuchten erfolgten im 10 l Maßstab im Biostat Fermenter. Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde die Anzucht durch Abkühlen abgebrochen und die Zellen mit einer Durchlaufzentrifuge (Westphalia) geerntet. Die Zellen wurden in dem für die Ribosomenisolierung notwendigen Puffer gewaschen und bei -70°C aufbewahrt.

4. Aufbewahren von Kulturen

Kulturen von methanogenen Bakterien wurden in 20%iger Glycerinlösung (1 ml 40 % Glycerin und 1 ml Medium in Hungate-

Röhrchen) unter einer Gasatmosphäre von 80 % N_2 /20 % CO_2 bei $-20^\circ C$ aufbewahrt. Mit Ausnahme von Methanococcus vanniellii blieben diese Organismen maximal ein Jahr lebensfähig. Kulturen von Eubakterien wurden ebenfalls in Glycerinlösung (45 %) bei $-20^\circ C$ aufbewahrt.

5. Präparation von Ribosomen, ribosomalen Untereinheiten und ribosomalen Proteinen

a) Methanogene Bakterien

In der späten exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min/6 000 x g) bei $4^\circ C$ geerntet. Sie wurden je nach Organismus (siehe Tabelle 2) in Puffer A (20 mM Tris/Cl pH 7.5; 10 mM Mg-Acetat; 30 mM NH_4Cl ; 2 mM DTT) oder Puffer B (20 mM Tris/Cl pH 7.5; 25 mM Mg-Acetat; 30 mM NH_4Cl ; 2 mM DTT) gewaschen und bei $-70^\circ C$ aufbewahrt. Zur Ribosomenisolierung wurden sie in doppeltem Volumen Puffer A oder B resuspendiert, mit 2 $\mu g/ml$ DNase I, Grad 2, versetzt und über zwei Passagen durch die French-Press-Zelle bei 16 000 p.s.i. aufgebrochen.

Zellen von Mc. vanniellii wurden durch Einfrieren und Auftauen lysiert.

Durch Zentrifugation erst 10 min bei 8 000 x g und dann 30 min bei 30 000 x g wurden S30-Extrakte hergestellt.

70S Ribosomen wurden durch dreistündige Zentrifugation bei 45 000 rpm im Beckman 55.2 Ti-Rotor sedimentiert. Die Ribosomen wurden im entsprechenden Puffer resuspendiert und auf eine Konzentration von 150 A_{260}/ml eingestellt. 1 ml dieser Ribosomensuspension wurde auf einen 10% bis 30%igen Saccharosedichtegradienten (Volumen 32 ml) aufgetragen. Die Herstellung von Gradienten erfolgte durch Einfrieren und Auftauen einer 20 % Saccharoselösung. Die Gradienten wurden 65 min bei 40 000 rpm im TV 850 (Du Pont) zentrifugiert.

Das Entleeren der Gradienten erfolgte mit Hilfe eines Densi-

flowgerätes (Buchler) und einer peristaltischen Pumpe (LKB). Die Messung der Absorption bei 260 nm in einer Durchflußküvette eines Gilford 2600 Spektralphotometers ermöglichte das Sammeln der 70S Fraktion.

Die 70S Partikel wurden durch Zentrifugation (12 h; 40 000 rpm) in einem 55.2 Ti-Rotor (Beckman) sedimentiert und im Hochsalzdissoziationspuffer C (20 mM Tris/Cl pH 7.5; 1 mM Mg-Acetat; 500 mM NH_4Cl ; 100 mM KCl; 2 mM DTT) oder D (20 mM Tris/Cl pH 7.5; 1 mM Mg-Acetat; 500 mM NH_4Cl ; 2 mM DTT) resuspendiert. Über zwei aufeinanderfolgende Saccharosedichtegradientenzentrifugationen (2 h, 10 min; 32 000 rpm im TV 850; 10°C) wurden anschließend ribosomale Untereinheiten isoliert.

b) "Schwefelabhängige" Archaeobakterien

Die Isolierung von Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten wurde für alle Organismen ähnlich durchgeführt. Nur die Herstellung zellfreier Extrakte und die verwendeten Puffer waren unterschiedlich. Im folgenden soll deshalb nur mehr auf unterschiedliche Bedingungen eingegangen werden.

Für die S30-Präparation von Sulfolobus wurden die Zellen in zweifachem Volumen Puffer E (20 mM Tris/Cl pH 7.5; 10 mM Mg-Acetat; 100 mM NH_4Cl ; 2 mM DTT) aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen erfolgte entweder in der French-Press-Zelle bei 10 000 p.s.i. oder durch Zugabe von Detergentien. 0.2 % SDS oder 0.5 % Triton X-100 in Puffer führten zu einer nahezu vollständigen Lyse der Zellen. Eine weitere Möglichkeit zum schonenden Aufschluß war das Verreiben der Zellpaste mit Aluminiumoxid (Alcoa A 305) in der Reibschale.

Zellen von Th. tenax, Tc. celer und D. mobilis wurden entweder durch Zugabe von 0.5 % Triton X-100 oder durch Homogenisieren mit Alcoa lysiert.

Für die Isolierung von Ribosomen aus S30 Extrakten wurde Puffer F mit 20 mM Tris/Cl pH 7.5; 25 mM Mg-Acetat; 500 mM NH_4Cl ; 2 mM DTT; 0.5 mM EDTA verwendet. Ribosomale Unterein-

heiten von Th. tenax und D. mobilis konnten ebenfalls in diesem Puffer isoliert werden. Ansonsten wurde für die Untereinheitenpräparation Puffer D verwendet.

c) *Halophile Bakterien*

Nach dem Ernten wurden die Zellen in einem Hochsalz-Waschpuffer (10 mM Tris/Cl pH 7.0; 4.5 M NaCl; 0.03 M KCl; 0.1 M $MgCl_2$) gewaschen, in Ribosomenpuffer (10 mM Tris/Cl pH 7.0; 4 M KCl; 100 mM MgCl) resuspendiert und bei 12 000 p.s.i. in der French-Press aufgebrochen. Der S30-Extrakt wurde wie vorher beschrieben hergestellt und ribosomale Partikel daraus in der Ultrazentrifuge sedimentiert. Die Ribosomen wurden in Dissoziationspuffer (3 M KCl; 500 mM NH_4Cl ; 10 mM $MgCl_2$; 20 mM Tris/Cl pH 8.0) aufgenommen und die ribosomalen Untereinheiten über zweimalige Dichtegradientenzentrifugation präpariert. Die Gradienten wurden mittels einer Gradientenmischkammer hergestellt, da durch Einfrieren und Auftauen auch Salzgradienten entstanden wären.

d) *Saccharomyces cerevisiae*

80S Ribosomen wurden von Herrn W. Stöcklein zur Verfügung gestellt. Ribosomale Untereinheiten wurden nach der von Stöcklein und Piepersberg (1980) beschriebenen Methode präpariert.

e) *Eubakterien*

Die Ribosomenisolierung wurde im wesentlichen nach der von Kaltschmidt und Wittmann (1970) beschriebenen Methode durchgeführt.

f) *Präparation ribosomaler Proteine*

Aus Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten wurde mit einer

Essigsäureextraktion (Hardy et al., 1969) ribosomales Protein isoliert.

6. Elektrophorese-Methoden

a) Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Für die Auftrennung ribosomaler Proteine wurden lineare Gradientengele von 12.5 % bis 20 % Acrylamid oder 15 % bis 25 % Acrylamid verwendet. Von TP30 (Totalprotein der 30S Unter-einheit) wurden 15 µg, von TP50 20 µg und von TP70 35 µg pro Gelspur aufgetragen. Zum Anfärben der Proteine wurde 0.2 % Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva) in 30 % Methanol und 10 % Eisessig verwendet.

b) Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophoresen zur Auftrennung ribosomaler Proteine

Zwei Elektrophoresesysteme kamen für die Auftrennung ribosomaler Proteine zur Anwendung:

- System A nach Geyl et al. (1981)

Die Trennung der Proteine erfolgte in der ersten Dimension in einem 4 % Gel bei pH 5.0 entsprechend der Ladung der Proteine, in der zweiten Dimension bei pH 4.2 in einem 18 % Gel überwiegend entsprechend der Größe.

- System B nach Mets und Bogorad (1974)

Die erste Dimension ist mit System A identisch. Die Gele der ersten Dimension wurden vor Anpolymerisieren auf die zweite Dimension in 0.5 M Tris/Cl pH 6.8 mit 1 % SDS äquilibriert. Für die zweite Dimension wurden 15 % Polyacrylamid-SDS-Gele verwendet.

c) Auftrennung von Gesamtzellprotein nach O'Farrell

Gesamtzellprotein von methanogenen Bakterien, das mit ^{14}C -L-Phenylalanin oder mit ^{35}S -L-Methionin radioaktiv markiert worden war, wurde nach O'Farrell (1977) präpariert und zweidimensional aufgetrennt. Pro Gel wurde eine Extraktmenge mit zirka 100 000 cpm Radioaktivität aufgetrennt. Nach dem Trocknen wurde eine Autoradiographie auf XOMat XR5 Röntgenfilmen (Kodak) durchgeführt. Die Exposition dauerte zwei bis drei Wochen.

d) Reelektrophorese ribosomaler Proteine aus zweidimensionalen Gelen

Diese "dreidimensionale" Gelelektrophorese wurde modifiziert nach Pichon et al. (1979) durchgeführt. Nach zweidimensionaler Auftrennung der ribosomalen Proteine wurden die Gele eine Stunde lang mit Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbt und drei bis fünf Stunden lang entfärbt. Die Proteine wurden ausgestochen und dreimal jeweils 3 h in 10 ml 60 mM Tris/Cl pH 6.8; 0.5 % 2-Mercaptoäthanol äquilibriert. Zwei bis fünf Gelstücke eines Proteins wurden in eine Auftragstasche eines 15 % oder 20 % Polyacrylamidgeles nach Laemmli (1970) eingebracht. Nach der Elektrophorese erfolgte wiederum eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250.

7. Spaltung von ribosomalen Proteinen mit Cyanbromid

Die Spaltung wurde nach Stöffler-Meilicke et al. (1984) durchgeführt. 0.5 mg von TP70 wurden in 0.5 ml 70 % Ameisensäure, 0.014 M 2-Mercaptoäthanol gelöst. Dazu wurden 12 μl Cyanbromid (2 mg/ml in Acetonitril) gegeben und der Ansatz 3 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden nochmals 12 μl Cyanbromid zugegeben und der Ansatz 18 h bei 37°C im Dunkeln belassen. Die Reaktion wurde nach 1:5 Verdünnung mit

H₂O abgebrochen. Nach Dialyse gegen 1 % Essigsäure wurde der Ansatz lyophilisiert. Der ganze Vorgang wurde nochmals wiederholt.

8. Test auf Phosphorylierung ribosomaler Proteine

Für die Anzucht von Mb. bryantii, H. halobium, S. solfataricus wurden Medien mit verringertem Phosphatgehalt nach J. Falkenstein (1979) verwendet. 10 ml Medium wurden mit 1 mCi ³²P Orthophosphat supplementiert und mit geringer Zellzahl beimpft; nach Erreichen der stationären Phase wurde aus den geernteten Zellen mittels einer Essigsäureextraktion das gesamte Protein isoliert. Dieses Protein wurde nach Geyl et al. (1981) zweidimensional aufgetrennt; die Elektropherogramme wurden nach Einschweißen in Plastikfolien einer Autoradiographie unterzogen.

9. In vivo Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in Zellprotein methanogener Bakterien

5 ml Kulturen von Mc. vannielii in Medium nach Ferry und Wolfe (1977) und von Mb. thermoautotrophicum in Standardmedium wurden nach dem Animpfen mit einem Tropfen einer exponentiell gewachsenen Vorkultur 4 µCi/ml ¹⁴C-L-Phenylalanin (363 mCi/mmol) oder 2 µCi/ml ³⁵S-L-Methionin (275 mCi/mmol) zugegeben. Gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet; das Zellprotein wurde nach O'Farrell zweidimensional aufgetrennt.

Zur Messung des radioaktiven Einbaus wurden 10 µl der Kultur mit einem Tropfen Rinderserumalbuminlösung (1 mg/ml) und mit 1 ml 10 % Trichloressigsäure gemischt und 20 min bei 90°C inkubiert. Nach Abkühlen in Eis wurde das Präzipitat auf einem Glasfiberfilter gesammelt, mit 10 % Trichloressigsäure und kaltem 70 % Äthanol gewaschen, getrocknet und die Radioaktivität in Toluol mit 0.5 % Diphenyloxazol (PPO) in einem Flüssigszintillationspektrometer MR 300 (Kontron) bestimmt.

Von 0.5 ml der Kultur wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) durchgeführt.

10. Immunologische Methoden

a) Präparation von Antiseren gegen ribosomale Proteine

Gereinigte ribosomale Untereinheiten $\sim 100 A_{260}$ von 30S Untereinheiten und $150 A_{260}$ von 50S Untereinheiten wurden mit inkompletten Freund'schem Adjuvans im Verhältnis 1:1 gemischt und Kaninchen subcutan injiziert. Nach 21 Tagen wurde diese Injektion auf die gleiche Weise wiederholt. Acht bis zehn Tage nach dieser zweiten Immunisierung wurden dem Kaninchen zirka 40 ml Blut aus der Ohrvene abgenommen. Boosterinjektionen mit der gleichen Menge an Immunogen erfolgten, wenn erforderlich, alle vier Wochen.

b) Herstellung von Rohseren und Isolierung der Immunglobulin-Fraktion

Rohseren und Immunglobulin-Fraktion wurden nach Piepersberg et al. (1975) hergestellt.

c) Anreicherung der IgG-Antikörper

Hierzu wurden zwei Methoden angewandt:

- Die Immunglobulin-Fraktion wurde durch Chromatographie an Sephadex G 150 nach Campbell et al. (1970) aufgetrennt. Die IgG Fraktion konnte vollständig abgetrennt werden. IgA und IgM waren leicht kreuzkontaminiert.
- Als weitere Möglichkeit zur Anreicherung von IgG-Antikörpern wurde eine Anionenaustauscherchromatographie in PBS (phosphat buffered saline; 15 mM KPO_4 pH 7.0; 50 mM NaCl) an DEAE-Cellulose (DE 52, Whatman) verwendet.

Die IgG Fraktion erscheint bei dieser Chromatographie der Immunglobulin-Fraktion im Ausschlußvolumen, während IgA- und IgM-Moleküle zurückgehalten werden.

d) *Immunodoppeldiffusion*

Die Experimente wurden nach Ouchterlony (1968) mit Modifikationen durchgeführt, die zur Analyse von Ribosomen notwendig sind (Stöffler und Wittmann, 1971; Stöffler, 1974).

e) *Immunoblotting*

Im wesentlichen wurde nach der Methode von Howe und Hershey (1981) vorgegangen. Ribosomale Proteine wurden elektrophoretisch entweder auf 15 % bis 25 % SDS-Polyacrylamid-Gradientengelen oder auf zweidimensionalen Gelen aufgetrennt und elektrophoretisch auf Nitrocellulosefilter in einer BioRad blot Kammer (60 V, 2 h für SDS-Gele; 60 V, 6 h für zweidimensionale Gele) transferiert. Der blot-Puffer für SDS-Gele bestand aus 25 mM Tris; 192 mM Glycin und 20 % Methanol (pH 8.3) und für zweidimensionale Gele wurde ein Puffer aus 0.7 % Essigsäure und 6 M Harnstoff verwendet. Die Proteine wurden mit Amidoschwarz (0.1 % in 45 % Methanol und 10 % Essigsäure) auf den Nitrocellulosefiltern angefärbt.

Die gefärbten Filter wurden mit 3 % Rinderserumalbumin in gepufferter Saline (0.9 % NaCl; 10 mM Tris/Cl pH 7.4) zur Absättigung eine Stunde lang bei 37°C inkubiert und einmal in Puffer Z (0.2 % SDS; 0.5 % Triton X-100; 0.9 % NaCl; 10 mM Tris/Cl pH 7.4; 0.5 % Rinderserumalbumin) gewaschen. Antiseren wurden 1:100 in Puffer Z verdünnt und mit den Filtern über Nacht inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Filter (jeweils 20 min) mit Puffer Z ohne Rinderserumalbumin wurden sie mit 20 ml Puffer Z mit 2.5 μCi ^{125}J markiertem Protein A von Staphylococcus aureus (3 - 10 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) 3 h bei Raumtemperatur behandelt.

Anschließend wurden die Filter jeweils fünfmal 30 min lang mit Puffer Z ohne Rinderserumalbumin gewaschen, dann getrocknet und 12 h bis 48 h exponiert (Kodak XOMat XR5 Röntgenfilm).

f) Abtrennung spezifischer Immunglobuline - Kontrollserum

Es kamen zwei Methoden zur Anwendung:

- Spezifische IgG Antikörper wurden aus den Seren durch eine Affinitätschromatographie abgetrennt. Hierzu wurde 10 mg ribosomales Protein in Puffer G (1 M LiCl; 20 mM KPO₄ pH 7.0) mit 0.5 g Affinitätsadsorbens (Silikatträgermaterial, Glutardialdehyd aktiviert; Boehringer Mannheim) 5 h leicht geschüttelt. In einer kleinen Säule wurde mit dem Puffer G gespült bis das Eluat proteinfrei ($A_{280} < 0.05$) war. Darauf wurde mit 0.3 M Äthanolamin/HCl pH 7.5 für 45 min gespült, um die Aldehydgruppen abzusättigen, mit Puffer G, 1 M Propionsäure und nochmals Puffer G nachgewaschen. Das so angekoppelte ribosomale Protein wurde über Nacht mit 1 ml Antiserum (ca. 10 - 20 mg/ml Protein) inkubiert. Über ein Säulchen wurde das Adsorbens abgetrennt und es wurde mit 1,5-fachem Volumen des Adsorbens nachgewaschen. Dieses Eluat wurde gegen PBS dialysiert und über ein "spot immunoblotting" auf vollständige Abtrennung der spezifischen Antikörper getestet. Spezifische Antikörper konnten durch Spülen der Säule mit 1 M Propionsäure, anschließend Dialysieren des Eluats gegen 1 mM Essigsäure und Lyophilisieren erhalten werden.
"Spot-immunoblotting" wurde so durchgeführt, daß verschiedene Antigenmengen auf trockene Nitrocellulosefilter aufgetropft wurden. Nach Eintrocknen der Proben wurde genau nach der bereits beschriebenen Immunoblotting-Vorschrift vorgegangen.
- Eine zweite Möglichkeit zur Herstellung von Kontrollseren war die Absättigung der Antiseren mit homologem Antigen.

Dazu wurden 0.2 ml eines Antiserums gegen einzelne ribosomale Proteine mit 10 µg homologem Protein oder 0.2 ml eines Antiserums gegen ribosomale Untereinheiten mit 1 A₂₆₀ der homologen Untereinheiten in Puffer A 1 h bei 37°C inkubiert. Nach 1 h auf Eis wurde das Präzipitat abzentrifugiert und der Überstand als Kontrollserum (unspezifische Antikörper) in einem Immunoblotting-Experiment getestet, in dem auch homologes Antigen mit aufgetragen war.

11. Genetische Methoden

a) Präparation von λ-DNS

Es wurde die Methode nach Schrenk und Weisberg (1975) mit Modifikationen nach Wirth et al. (1977) durchgeführt.

b) Plasmidisolierungen

Für die Isolierung von Plasmiden über Gleichgewichtszentrifugation im Cäsiumchloriddichtegradienten wurde nach Clewell und Helinski (1969) vorgegangen. Plasmidschnellisolationen erfolgten nach der Methode von Klein et al. (1980).

c) Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten erfolgte in horizontalen, 0.7 % bis 1.2%igen Agarosegelen (Peacock und Dingman, 1969). Als Auftragspuffer wurden "Agarose beads" nach Schaffner et al. (1976) verwendet.

d) Isolierung von DNS-Fragmenten aus dem Agarosegel

Die Isolierungsmethode nach Maniatis et al. (1982) hat sich hierfür bewährt. DNS-Fragmente wurden in "low melting" Agarosegelen aufgetrennt; die Banden wurden sehr knapp ausge-

schnitten und in Reaktionsgefäßen mit einem Volumen sterilen H_2O bidest versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation bei $65^\circ C$ erfolgte eine Phenolextraktion. Die wäßrige Phase wurde zwei weitere Male extrahiert, zuerst mit Phenol/Chloroform (1:1), dann mit Chloroform. Anschließend wurde die DNS in 0.3 M Na-Acetat mit Äthanol ausgefällt.

e) Klonierung

Vektorplasmid-DNS und zu klonierende DNS wurden mit Restriktionsendonuklease geschnitten. Die Vektor-DNS wurde zusätzlich nach Ullrich et al. (1977) mit alkalischer Phosphatase behandelt. Danach wurden Vektor-DNS und zu klonierende DNS im molaren Verhältnis 1:1 gemischt und nach Maniatis et al. (1982) über Nacht bei $4^\circ C$ zur Ligation inkubiert.

f) Transformation

Transformationsexperimente wurden nach Cohen et al. (1972) durchgeführt.

g) Radioaktive Markierung von DNS-Fragmenten

Plasmid-DNS und λ -DNS wurden erst mit einer Restriktionsendonuklease verdaut und darauf nach Maniatis et al. (1982) "nick translatiert". Pro μg DNS wurden 100 μCi $\alpha^{32}P$ ATP ($>7\ 000\ Ci/mmol$) eingesetzt. Die Nick-translations-Probe wurde über Sephadex G 50 Minisäule (Pasteurpipette) in TBE Puffer (90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2.5 mM EDTA, pH 8.3) von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden abgetrennt. Der Einbau wurde über "Cerenkov-Messung" im Flüssigszintillationsspektrometer bestimmt.

h) Hybridisierung mit heterologer, radioaktiv markierter DNS-Probe

In Agarosegelen aufgetrennte DNS-Fragmente wurden nach

Denaturierung der DNS (Southern, 1975) durch Vakuum-blotting (Perferoen et al., 1982) auf Nitrocellulosefilter transferiert. Die Filter wurden 2 h bei 80°C eingebacken. Vor der Hybridisierung wurden die Filter mit einer Lösung nach Denhardt (1966) in 6 x SSPE (1 x SSPE: 0.15 M NaCl; 0.15 M Na₂EDTA; 0.01 M NaH₂PO₄; pH 7.0) und 0.5 % SDS bei 50°C für mindestens 3 h prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in 6 x SSPE, 1 x Denhardt-Lösung, 0.5 % SDS und etwa 10 µCi/ml radioaktiver DNS (ca. 0.1 µg/ml) für 24 h. Nach dreimaligem Waschen in Hybridisierungspuffer ohne Radioaktivität und zweimaligem Waschen mit 2 x SSPE, 0.5 % SDS wurden die Filter getrocknet und mit Verstärker-Folie (Curix MR 600 Agfa-Gevaert) fünf bis acht Tage bei -70°C exponiert.

12. Besondere Chemikalien und Bezugsquellen

Protein A (¹²⁵J) stammte von NEN, Dreieich. ³²PO₄, α³²-P-ATP, ¹⁴C-L-Phenylalanin und ³⁵S-L-Methionin wurden von NEN, Dreieich, oder Amersham-Buchler, Braunschweig, bezogen.

Freund'sches Adjuvans war von den Behringwerken, Nürnberg. Rinderserumalbumin, T4-Ligase, alkalische Phosphatase, DNS-Polymerase I, DNase I und ein Großteil der verwendeten Restriktionsenzyme stammte von Boehringer, Mannheim. Andere Restriktionsenzyme waren von BRL. Sephadex G 50 und G 150 war von Pharmacia, Uppsala; DE 52-Cellulose war von Whatman Biochemicals, Maidstone, bezogen worden.

C. ERGEBNISSE

I. Proteinzusammensetzung archaeobakterieller Ribosomen

1. Elektrophoretische Charakterisierung ribosomaler Proteine methanogener Bakterien

Die Bestimmung der Anzahl der ribosomalen Proteine stellt eine grundlegende Voraussetzung für die Analyse von Struktur und Funktion des Ribosoms und für den Vergleich der Archaeobakterienribosomen mit Ribosomen von Eubakterien und Eukaryonten dar. Als methodischer Leitfaden für die Untersuchung der ribosomalen Proteine von Archaeobakterien wurden die Arbeiten von Kaltschmidt und Wittmann (1970) herangezogen. Sie bestimmten für E. coli die Anzahl der ribosomalen Proteine mit Hilfe gelelektrophoretischer Methoden.

a) Zur Isolierung von ribosomalen Untereinheiten

Aus den drei Ordnungen der methanogenen Bakterien wurden fünf Organismen für die Versuche ausgewählt (Tabelle 2). Entsprechend dem Vorgehen bei E. coli sollten in Hochsalzpuffer ribosomale Untereinheiten über Saccharosedichtegradientenzentrifugation präpariert und deren Proteine nach Extraktion über zweidimensionale Gelelektrophorese identifiziert werden.

Die ersten Versuche zur Reinigung ribosomaler Untereinheiten von methanogenen Bakterien zeigten, daß bei Auftrennung aus S30-Extrakten, die unter dissoziierenden Bedingungen für Ribosomen hergestellt wurden, die kleinere Untereinheit mit einem hellgelben Komplex verunreinigt war. Um diese Kontamination zu umgehen, wurden zuerst Bedingungen für die Isolierung von 70S Ribosomen über Saccharosedichtegradienten-

zentrifugation ausgearbeitet; 70S wurden dann anschließend dissoziiert und aus dieser Präparation die Untereinheiten über zweimalige Gradientenzentrifugation gereinigt.

Ein Vergleich zweidimensionaler Elektropherogramme von ribosomalen Proteinen der gereinigten und der kontaminierten 30S Untereinheitenpräparationen erbrachte den Nachweis, daß die kontaminierte 30S Untereinheit drei zusätzliche Proteine im Molekulargewichtsbereich von 40 000 D bis 50 000 D aufwies. In einer später erschienenen Veröffentlichung von Yamazaki (1982) wurde gezeigt, daß die Hydrogenase von Mc. vannielii in zwei Formen mit Molekulargewicht von 340 000 D und 1.3×10^6 D aufgereinigt werden kann und daß drei verschiedene Untereinheiten mit $M_R = 56\ 000$ D, $42\ 000$ D und $35\ 000$ D vorliegen. Molekulargewicht der multimeren Form um 1×10^6 D, Untereinheitenstruktur und Coenzym F_{420} -Gehalt (Absorptionsmaximum bei 420 nm) sind Indizien dafür, daß die hellgelbe Verunreinigung der 30S Untereinheit durch den co-sedimentierenden Hydrogenasekomplex verursacht wurde.

In Tabelle 2 sind für die untersuchten Organismen die Puffer aufgelistet, die für die Isolierung von 70S Ribosomen, für Dissoziation und nachfolgende Reinigung der Untereinheiten notwendig waren. Kriterien für die Optimierung der Puffer waren Schärfe der Trennung im Dichtegradienten, minimale Dimerisierung der 30S Untereinheit und Stabilität nach wiederholten Zentrifugationen.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, unterscheiden sich Vertreter der Ordnung Methanobacteriales von den übrigen untersuchten Organismen in der Stabilität ihrer 70S Ribosomen. So erhielt man bei Ribosomenpräparationen mit Puffer A kaum 70S Partikel. Erst bei Erhöhung der Magnesiumkonzentration auf 25 mM lagen zirka zwei drittel der Ribosomen in der 70S-Form vor. Eine weitere Erhöhung der Magnesiumkonzentration bis 100 mM brachte keine Verbesserung der 70S Ausbeute. Die

Tabelle 2: Für die Isolierung von 70S Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten von methanogenen Bakterien verwendete Puffer

Ordnung	Organismen	Puffer für die Isolierung von	
		70S Rib.	30S/50S UE
Methanobacteriales	<i>Mb. thermoautotrophicum</i>	B	D
	<i>Mb. bryantii</i>	B	D
	<i>Mb. arboriphilus</i>	B	D
Methanococcales	<i>Mc. vannielii</i>	A	C
Methanomicrobiales	<i>Msp. hungatei</i>	A	D

Erhöhung der Konzentration einwertiger Ionen förderte die Dissoziation. Im Gegensatz dazu konnten mit Puffer A die Ribosomen von Mc. vannielii und Msp. hungatei nahezu quantitativ als 70S isoliert werden.

Ribosomale Untereinheiten ließen sich bei guter Trennschärfe und Ausbeute mit Hochsalzpuffer D präparieren, lediglich für die Untereinheitenpräparation von Mc. vannielii mußte aufgrund der extremen Dimerisation der 30S Untereinheit Puffer C gewählt werden. So präparierte Untereinheiten von Mc. vannielii waren in einem Poly(U)-abhängigen in vitro Translationssystem aktiv (Elhardt und Böck, 1982).

b) Molekulargewichtsbereich der ribosomalen Proteine

Die Molekulargewichtsverteilung der ribosomalen Proteine wurde mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. In Abbildung 2 ist eine Abbildung eines 15 % bis 25 % SDS Polyacrylamid-Gradientengels dargestellt, wobei in Spur 4 bis 9

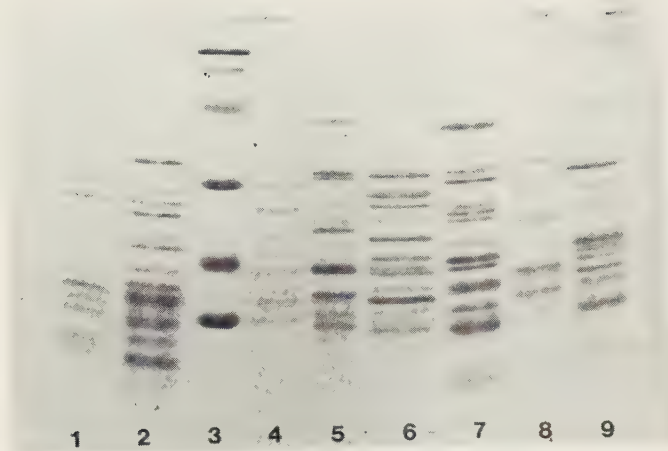


Abbildung 2:

Eindimensionale Auftrennung ribosomaler Proteine über SDS-Gelelektrophorese von (1) TP30, (2) TP50 von *E. coli*; (4) TP30, (5) TP50 von *Mb. bryantii*; (6) TP30, (7) TP50 von *Mc. vannielii*; (8) TP30, (9) TP50 von *Msp. hungatei*; (3) Molekulargewichtsstandard:

Protein	M_R
Phosphorylase B	92 500 D
Rinderserumalbumin	68 000 D
Ovalbumin	45 000 D
Carboanhydrase	31 000 D
Sojabohnen Trypsin Inhibitor	21 500 D
Lysozym	14 400 D

ribosomales Totalprotein der 30S Untereinheit (TP30) beziehungsweise der 50S Untereinheit (TP50) von methanogenen Bakterien der drei Ordnungen aufgetrennt wurde. Als Referenzproteine wurde in Spur 1 und 2 TP30 beziehungsweise TP50 von *E. coli* und in Spur 3 ein Molekulargewichtsstandard (M_R siehe Abbildung 2) aufgetragen.

Ein Vergleich der Proteinmuster führt zu folgenden Feststellungen:

- (i) Am Aufbau der 30S Untereinheit ist kein Protein mit einem höheren apparenten Molekulargewicht als 31 000 D beteiligt.
- (ii) Die 50S Untereinheit methanogener Bakterien besitzt im Gegensatz zu Eubakterien mindestens ein Protein mit $M_R \sim 40\,000$ D.
- (iii) Ähnlichkeiten im Proteinmuster der methanogenen Bakterien sind vor allem im Elektropherogramm des Totalproteins der 50S Untereinheiten zu erkennen. Charakteristisch vor allem ist das Laufverhalten der drei größten Proteine der 50S Untereinheiten. E. coli besitzt in diesem Molekulargewichtsbereich nur ein Protein (L2; MG nach Aminosäuresequenz: 29 700 D; Kimura et al., 1982).

c) Zweidimensionale Auftrennung ribosomaler Proteine

Zur Bestimmung der Anzahl ribosomaler Proteine wurden die Proteine der 30S und 50S Untereinheiten zweidimensional im System von Geyl et al. (1981) aufgetrennt. Aufgrund der im Vergleich mit E. coli acideren Proteine der methanogenen Bakterien mußte der pH-Wert von Probenpuffer und oberen Gelpuffer von 4.0 auf 3.5 gesenkt werden. Umgekehrte Polung der ersten Dimension erbrachte den Nachweis, daß alle Proteine bei richtiger Polung ins Gel einwandern; also alle Proteine einen pK_i größer als 3.5 besitzen.

Zweidimensionale Elektropherogramme von TP30 und TP50 von Mc. yannielii sind in Abbildung 3 dargestellt. "Protein-spots", die reproduzierbar von verschiedenen Präparationen an der gleichen Stelle erschienen und nur an einer Untereinheit vorhanden waren, wurden nach dem Prinzip von Kaltschmidt und Wittmann (1970) numeriert. So wurden die Proteine für jede

Untereinheit links oben beginnend entlang horizontalen Linien bezeichnet.

Bei Mc. vanniellii wandern zwei Proteine der 30S und 50S Untereinheit auf identische Positionen im Gel. Obwohl für E. coli ein Protein nachgewiesen wurde, das am Aufbau beider



Abbildung 3:

Zweidimensionale Elektropherogramme ribosomaler Proteine der 30S (A) und der 50S (B) Untereinheit von Mc. vanniellii

Untereinheiten beteiligt ist (S20 = L26; Stöffler, 1971; Stöffler, 1974), wurden diese beiden Proteine von Mc. vanniellii nicht mit in die durchlaufende Nomenklatur einbezogen. Sie wurden vorerst als a- und b bezeichnet, da zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig unterschieden werden konnte, ob es sich um einen noch anhaftenden Translationsfaktor, ein anhaftendes cytoplasmatisches Protein oder um ein ribosomales Protein handelt. Immunologische Daten geben allerdings einen Hinweis, daß es sich tatsächlich um ein ribosomales Protein handelt, da ein Antiserum gegen 70S Ribosomen von Mb. bryantii mit diesen beiden Proteinen kreuzreagiert (Abbildung 4).

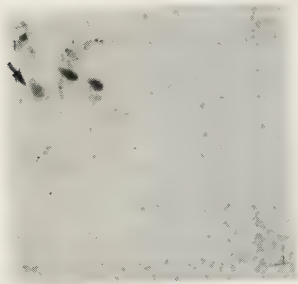


Abbildung 4:

"Immunoblot" von TP50 Mc. vanniellii mit Antiserum gegen ribosomale Proteine von Mb. bryantii

Abbildung 5 und Abbildung 6 zeigen Elektropherogramme ribosomaler Proteine von Mb. thermoautotrophicum, Mb. bryantii, Mbr. arboriphilus und Msp. hungatei. Bei Mbr. arboriphilus und Msp. hungatei läuft gleichfalls ein Protein der 30S und 50S Untereinheit in gleiche Positionen im Gel. Die Proteinverteilung in den Elektropherogrammen erlaubt folgende Aussagen:

- (i) Ribosomale Proteinmuster der 30S und 50S Untereinheit von Mb. thermoautotrophicum und Mb. bryantii sind sehr ähnlich. Diese beiden Organismen zeigen auch größere



Abbildung 5:

Zweidimensionale Elektropherogramme von TP30 (A), TP50 (B) aus Mb. thermoautotrophicum und von TP30 (C), TP50 (D) aus Mb. bryantii

Übereinstimmung ihrer ribosomalen Protein-Muster mit dem von Mbr. arboriphilus.

- (ii) Proteine der 30S Untereinheit von Mb. thermoautotrophicum, Mb. bryantii und Mbr. arboriphilus sind auffällig acide. Alle Proteine befinden sich in der aciden, linken Hälfte des Elektropherogramms.
- (iii) Aus den Elektropherogrammen der untersuchten Organismen lassen sich typische Charakteristika ableiten:
 - Alle 30S Untereinheiten weisen zwei kleine ribosomale Proteine mit ähnlichem Laufverhalten auf (S24,

S25 von Mc. vannielii beziehungsweise mit Pfeil gekennzeichnete Proteine in Abb. 5 A,C und Abb. 6 A, C).

- Die 50S Untereinheiten der methanogenen Bakterien zeichnen sich durch ein ähnliches Laufverhalten der schweren ribosomalen Proteine aus (siehe bei Mc. vannielii die Anordnung der Proteine L4, L3, L7, L11).

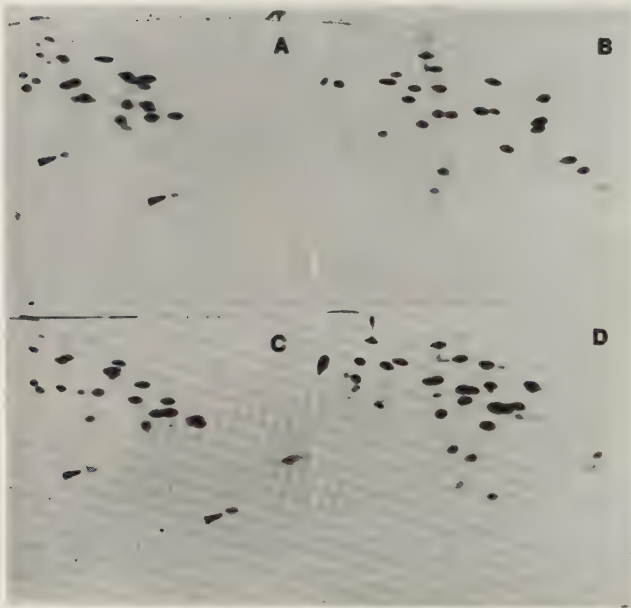


Abbildung 6:

Zweidimensionale Elektropherogramme von TP30 (A), TP50 (B) aus Mbr. arboriphilus und von TP30 (C), TP50 (D) aus Msp. hungatei

Trotz der Tatsache, daß die zweidimensionale Auftrennung von Totalprotein der 30S und 50S Untereinheit keine endgültige Aussage über die Individualität der ribosomalen Proteine zuläßt, wurde für alle untersuchten Organismen die Proteinzahl nach dem vorher beschriebenen Prinzip bestimmt. In Tabelle 3 ist die dabei erhaltene Anzahl der ribosomalen Proteine der untersuchten Organismen aufgelistet.

Tabelle 3: Proteinzahl der Ribosomen von fünf methanogenen Bakterien

Ordnung	Organismen	Zahl der Proteine an			
		30S	50S	beiden UE	70S
Methanobacteriales	<i>Mb.thermoautotrophicum</i>	22	32	-	54
	<i>Mb. bryantii</i>	23	32	-	55
	<i>Mbr. arboriphilus</i>	22	31	1	53-54
Methanomicrobiales	<i>Msp. hungatei</i>	21	34	1	55-56
Methanococcales	<i>Mc. vanniellii</i>	25	35	2	60-62

Angehörige der Ordnung Methanobacteriales besitzen eine einheitliche Proteinzahl sowohl an der 30S als auch an der 50S Untereinheit. Auffällig die niedrigere Proteinzahl im Vergleich zu 50S Untereinheiten von Msp. hungatei und von Mc. vanniellii. Mc. vanniellii weist eine deutlich erhöhte Proteinzahl der 30S Untereinheit auf, die diesen Organismus damit von den anderen methanogenen Bakterien etwas absetzt.

2. Elektrophoretische Charakterisierung ribosomaler Proteine von "schwefelabhängigen" Archaeobakterien

Die Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung der Ribosomen wurden auch auf den zweiten Ast der Archaeobakterien, die "schwefelabhängigen" Archaeobakterien, ausgedehnt. Dafür wurden drei *Sulfolobus* Isolate, die aus verschiedenen geographischen Regionen der Erde isoliert worden waren (*S. solfataricus*, P1, aus Italien; *S. solfataricus*, N1, aus Japan; *S. acidocaldarius* aus USA), und drei Vertreter der Ordnung Thermoproteales, nämlich *Th. tenax*, *D. mobilis* und *Tc. celer*, ausgewählt.

a) Isolierung ribosomaler Untereinheiten von *Sulfolobus*

Das bewährte Prinzip der Isolierung von 70S Ribosomen über Saccharosedichtegradientenzentrifugation und nachfolgende Dissoziation und Reinigung der Untereinheiten sollte auch bei *Sulfolobus* angewendet werden. Dabei konnten 70S Ribosomen nur mit Puffer X (20 mM Tris/Cl pH 7.5; 10 mM Mg-Acetat; 200 mM KCl; 2 mM DTT) erhalten werden. Nach Dissoziation und Zentrifugation der Untereinheiten im Saccharosedichtegradienten ergab sich jedoch, daß die Untereinheiten teilweise eine geringere Sedimentationsgeschwindigkeit aufwiesen, was auf teilweisen Zerfall hindeutete. Aus diesem Grund wurden die Untereinheiten aus den S30-Extrakten durch drei aufeinanderfolgende Saccharosedichtegradientenzentrifugationen isoliert.

Schwierig erwies es sich, bei *Sulfolobus* ribosomale Untereinheiten in größeren Mengen zu isolieren, da konzentrierte S30-Extrakte eine derart zähe Konsistenz besaßen, daß ein Auflagern auf Saccharosegradienten nicht möglich war. Hervorgehoben wurde diese Eigenschaft vermutlich durch Aggregate des Zellwandglykoproteins (Taylor et al., 1982; Michel et al., 1980). Ein Teil dieses Zellwandproteins konnte durch eine Fällung mit 4 % PEG 6000 abgetrennt werden. Eine vollständige

Abtrennung des Zellwandproteins wurde durch Chromatographie der Ribosomensuspensionen über Biogel A5m (BioRad) erreicht. Die Verunreinigung lief dabei im Ausschlußvolumen.

b) *Isolierung ribosomaler Untereinheiten von Thermoproteus tenax, Desulfurococcus mobilis und Thermococcus celer*

Der Aufbruch der Zellen erfolgte entweder durch Verreiben mit Alcoa oder mit 0.5 % Triton X-100. In beiden Fällen wirkte sich auch bei diesen Organismen das Zellwandprotein störend auf die Präparation aus. Bei Verwendung von Puffer G (20 mM Tris/Cl pH 7.5; 10 mM Mg-Acetat; 500 mM NH_4Cl ; 2 mM DTT; 0.5 mM EDTA) konnten nur von Tc. celer 70S Ribosomen über Saccharosedichtegradientenzentrifugation isoliert werden, während von Th. tenax und D. mobilis Untereinheiten erhalten wurden. Eine Verringerung der Ammoniumionenkonzentration auf 50 mM brachte das gleiche Ergebnis. Ribosomale Untereinheiten von Tc. celer wurden mit Puffer D präpariert.

c) *Molekulargewichtsverteilung der ribosomalen Proteine*

Eine eindimensionale gelelektrophoretische Auftrennung der ribosomalen Proteine der 30S und 50S Untereinheit der drei Sulfolobus-Isolate ist in Abbildung 7 dargestellt. Ein Vergleich der Spuren veranschaulicht, (i) daß keine Kreuzkontamination der ribosomalen Untereinheiten vorliegt, (ii) daß die drei Isolate ein nahezu identisches ribosomales Proteilmuster aufweisen.

Wie methanogene Bakterien besitzt auch die 50S Untereinheit von Sulfolobus mindestens ein ribosomales Protein mit $M_R \sim 40\,000$ D. Die Molekulargewichte der Proteine der 30S Untereinheit liegen alle zwischen 5 000 D bis 30 000 D.

Abbildung 8 demonstriert die Molekulargewichtsverteilung der ribosomalen Proteine von Th. tenax, Tc. celer, D. mobilis und zum Vergleich von S. solfataricus. Die "schwefelabhängigen"

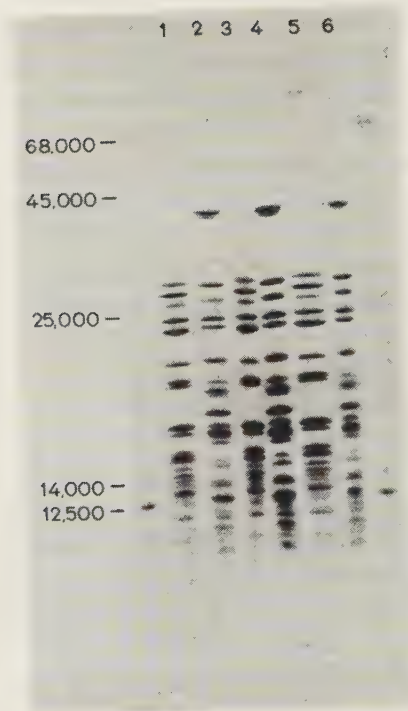


Abbildung 7:

SDS-Gelelektrophorese ribosomaler Proteine der 30S (1) und 50S (2) Untereinheiten von *S. solfataricus*, N1, der 30S (3) und 50S (4) Untereinheiten von *S. solfataricus*, P1, und der 30S (5) und 50S (6) Untereinheiten von *S. acidocaldarius*

Archaeobakterien unterscheiden sich im Proteinmuster deutlich voneinander. Ähnlichkeiten sind zu erkennen zwischen TP30 und TP50 von *Th. tenax* und *D. mobilis*. *Tc. celer* müßte eher *S. solfataricus* oder den methanogenen Bakterien zugeordnet werden. Im Falle von *Th. tenax* und *D. mobilis* sind mehrere Proteine der 50S Untereinheit mit (unterschiedlichem) Molekulargewicht über 30 000 D vorhanden. Dies ist ein typisches Merkmal für eukaryontische 60S Untereinheiten (Wool, 1979).

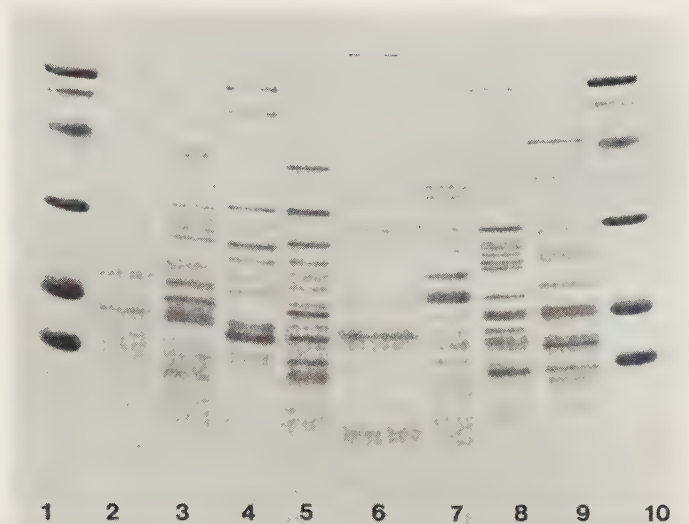


Abbildung 8:

SDS-Gelelektrophorese von TP30 (2), TP50 (3) S. solfataricus, P1; TP30 (4), TP50 (5) Tc. celer; TP30 (6), TP50 (7) Th. tenax; TP30 (8), TP50 (9) D. mobilis. (1) und (10) Molekulargewichtsstandard (siehe Abb. 2)

d) Bestimmung der Anzahl der ribosomalen Proteine mit zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe zweidimensionaler Gelelektrophorese für ribosomale Proteine nach Geyl et al. (1981) wurde die Bestimmung der Proteinzahl durchgeführt. Umgekehrte Polung der ersten Dimension bewies, daß bei richtiger Polung alle Proteine ins Gel einlaufen, das heißt kein Protein besitzt einen $pK_1 < 4.0$.

Abbildung 9 zeigt Elektropherogramme von ribosomalen Proteinen der 30S und 50S Untereinheit von S. solfataricus, Stamm P1. Für beide Untereinheiten wurde eine Nomenklatur nach dem Prinzip von Kaltschmidt und Wittmann (1970) aufgestellt.

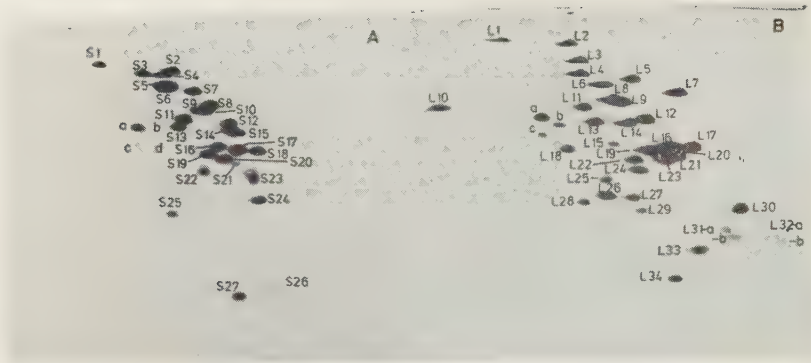


Abbildung 9:

Zweidimensionale Auftrennung ribosomaler Proteine der 30S (A) und 50S (B) Untereinheit von S. solfataricus, Stamm P1

Für die Benennung eines Proteins waren dieselben Kriterien maßgebend wie bei methanogenen Bakterien angeführt. Demnach erhält man für die 30S Untereinheit 27 Proteine und für die 50S Untereinheit 34 Proteine. Drei Proteine erschienen bei der 30S und 50S Untereinheit auf identischen Positionen im Gel. Sie wurden analog zum Vorgehen bei Mc. vanniellii mit a, b und c bezeichnet.

In Abbildung 10 sind Elektropherogramme von ribosomalen Proteinen der 30S und 50S Untereinheit von S. acidocaldarius (Abb. 10 A,B) und S. solfataricus, Stamm N1 (Abb. 10 D,E) dargestellt. Wie bereits aus der eindimensionalen Gelelektrophorese ersichtlich war, unterscheiden sich die Spezies, beziehungsweise Stämme, im ribosomalen Proteinmuster kaum. So unterscheidet sich S. acidocaldarius von beiden S. solfataricus Stämmen nur durch eine andere Wanderung von Protein S14 nahe an S17 und Stamm P1 besitzt ein acideres Protein L10 im Vergleich zu den anderen beiden Isolaten.

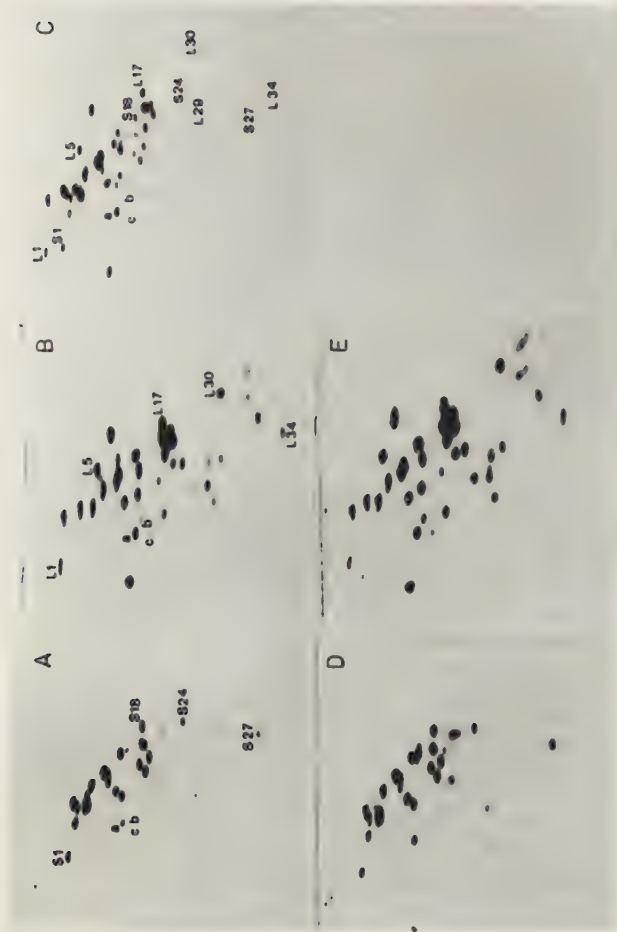


Abbildung 10:

Zweidimensionale Elektropherogramme ribosomaler Proteine: 30S (A), 50S (B) und 30S plus 50S (C) von S. acidocaldarius; 30S (D) und 50S (E) von S. solfataricus, NI

Die Ähnlichkeit der ribosomalen Proteinmuster dieser drei Vertreter der Gattung Sulfolobus, die in unterschiedlichen Erdteilen isoliert wurden, spricht (i) für die taxonomische Relevanz dieser Methode, (ii) für deren Reproduzierbarkeit und (iii) für die Reinheit der für die Präparation verwendeten Kulturen.

Abbildung 10 C zeigt ein Elektropherogramm eines Gemisches von TP30 und TP50 von S. acidocaldarius. Dabei ist deutlich die vollkommen identische Wanderung von Protein a, b und c festzustellen. Die Auftrennung von Gemischen der beiden Untereinheiten ermöglicht es, Proteine der 30S und 50S Untereinheit mit gleichem Laufverhalten nachzuweisen.

Die Analyse der ribosomalen Proteinzusammensetzung kürzlich isolierter Arten der neuen Ordnung Thermoproteales (Zillig et al., 1981 a,b; Zillig et al., 1983 a,b) sollte das Bild über den strukturellen Aufbau der Archaeobakterienribosomen abrunden.

Tabelle 4: Zahl der ribosomalen Proteine "schwefelabhängiger" Archaeobakterien

Ordnung	Organismen	Zahl der Proteine an			
		30S	50S	beiden UE	70S
Sulfolobales	<i>S. solfataricus</i>	27	34	3	61-64
Thermoproteales	<i>D. mobilis</i>	24	34	-	58
	<i>Th. tenax</i>	24	32	-	56
	<i>Tc. celer</i>	24	32	-	56

In Abbildung 11 sind Elektropherogramme ribosomaler Proteine der 30S und 50S Untereinheit von D. mobilis, in Abbildung 12 Elektropherogramme ribosomaler Proteine der Untereinheiten von Th. tenax und Tc. celer zu sehen. Die Anzahl der identifizierten Proteine ist in Tabelle 4 (siehe S. 42) aufgeführt.

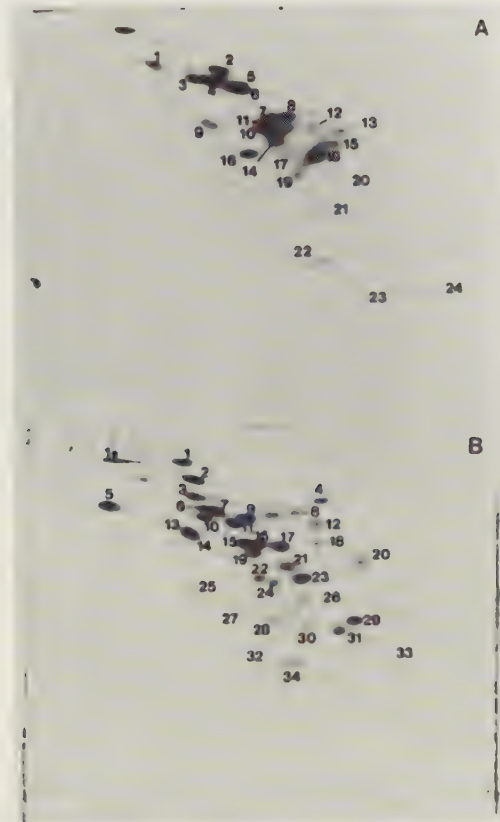


Abbildung 11:

Zweidimensionale Elektropherogramme ribosomaler Proteine der 30S Untereinheit (A) und der 50S Untereinheit (B) von D. mobilis



Abbildung 12:

Zweidimensionale Elektropherogramme ribosomaler Proteine der 30S Untereinheit (A) und 50S Untereinheit (B) von Th. tenax sowie der 30S Untereinheit und 50S Untereinheit von Tc. celer

Die drei Vertreter der Ordnung Thermoproteales unterscheiden sich von Sulfolobus vor allem in der Proteinkomplexität der 30S Untereinheit.

Die Proteine der ribosomalen Untereinheit von D. mobilis und Tc. celer wurden außerdem durch Elektrophorese mit dem zweidimensionalen Gelsystem nach Mets und Bogorad analysiert (Abb. 13).

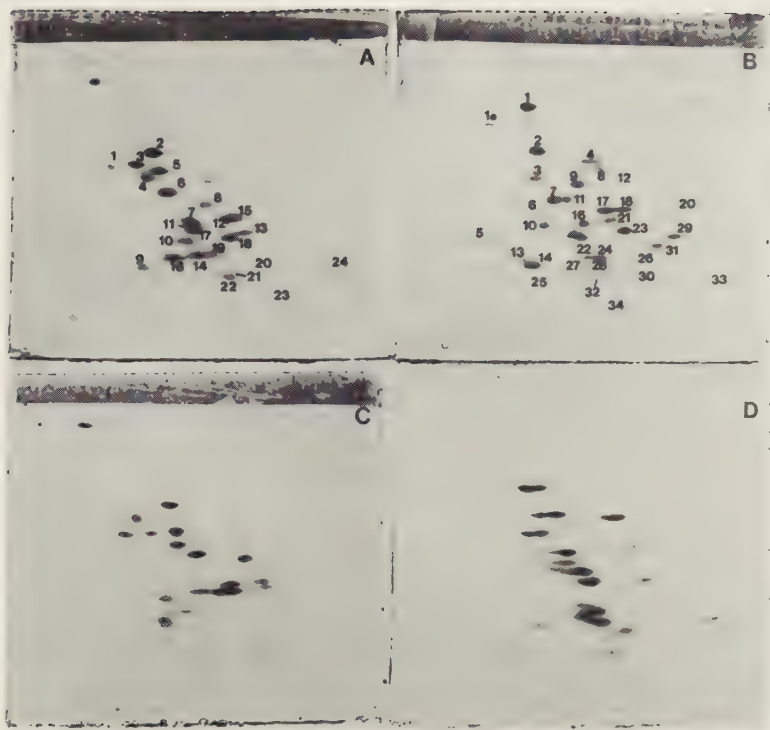


Abbildung 13:

Zweidimensionale Auftrennung ribosomaler Proteine nach Mets und Bogorad von (A) TP30 und (B) TP50 von D. mobilis sowie von (C) TP30 und (D) TP50 von Tc. celer

Die erste Dimension ist dabei identisch mit dem bisher verwendeten System von Geyl et al. (1981). In der zweiten Dimension werden die Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Molekulargewicht aufgetrennt. Aufgrund der gleichen ersten Dimension beider Systeme können identische Proteine in beiden Systemen identifiziert werden. Dies ist für TP30 und TP50 von

D. mobilis in Abbildung 13 A,B gezeigt. Mit beiden Systemen erhält man die gleiche Proteinzahl, obwohl Überlappungen im mittleren und unteren Molekulargewichtsbereich die Bestimmung nach dem System von Mets und Bogorad etwas schwieriger macht.

Elektropherogramme der Proteine der 30S Untereinheiten in Abbildung 13 lassen keine größeren Ähnlichkeiten im Laufverhalten erkennen. Dagegen ist die Proteinverteilung der 50S Untereinheiten von D. mobilis und Th. tenax ähnlich. Das Proteinmuster der 50S Untereinheit von Tc. celer erinnert eher an die 50S Untereinheit von Sulfolobus. Typisch für alle "schwefelabhängigen" Organismen ist das Laufverhalten der schweren Proteine der 50S Untereinheit (siehe bei S. solfataricus L2, L3, L4; bei D. mobilis L1, L2, L3).

3. Untersuchungen zur Individualität der in zweidimensionalen Elektropherogrammen identifizierten ribosomalen Proteine

Die Analyse der Proteinstruktur der archaebakteriellen Ribosomen mit zweidimensionaler Gelelektrophorese ist mit folgenden Schwierigkeiten, die das Ergebnis verfälschen, behaftet:

- Proteolyse
- Aggregatbildung (Dimerisierung)
- enzymatische Modifizierung (Phosphorylierung, Acetylierung)
- chemische Modifizierung (Oxidation, Carbamylierung)
- Verlust von Proteinen während der Präparation
- Isolierung von "nichtribosomalen" Proteinen zusammen mit Ribosomen
- keine Auflösung im verwendeten Gelsystem

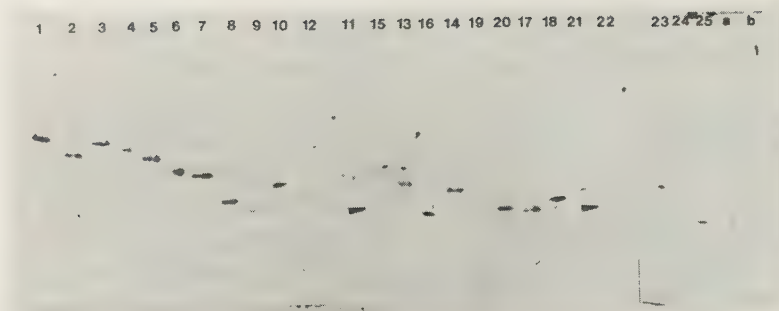
Um die Fehlerquellen einzugrenzen, wurde S. solfataricus, Stamm P1, und Mb. bryantii auf phosphorylierte ribosomale Proteine getestet. Bei keinem der beiden Organismen konnte eine Phosphorylierung der ribosomalen Proteine festgestellt werden. Phosphorylierung ribosomaler Proteine ist ein typisches Merkmal von Eukaryonten (Kramer et al., 1979) und ist bei Eubakterien noch nicht nachgewiesen worden.

Als weitere Stütze für die Individualität der in die Nomenklatur einbezogenen Proteine diente die Reelektrophorese ausgestochener Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen. Hierfür wurden die ribosomalen Proteine der 30S Untereinheit von Mc. vanniellii und von S. solfataricus ausgewählt.

In Abbildung 14 A,B ist das Ergebnis dargestellt. Fast alle Proteine von Mc. vanniellii (Abb. 14) weisen in dieser "dritten" Elektrophorese verschiedenes Laufverhalten auf, mit Ausnahme von a und b. Für die Proteine der 30S Untereinheit von S. solfataricus (Abb. 14 B) gilt das gleiche. Nur Proteine S5, S6 und Proteine S20, S21 laufen im SDS-Gel auf gleiche Höhe.

siehe Abbildung 14 →

A



B

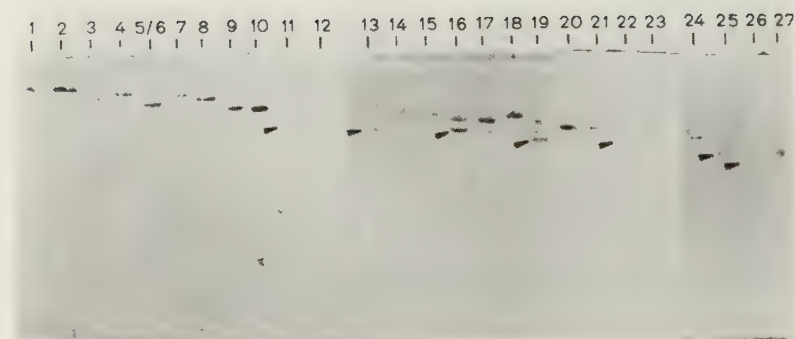


Abbildung 14:

Reelektrophorese ribosomaler Proteine, die aus zweidimensionalen Gelen ausgestochen wurden, in SDS-Gelen:

(A) 30S Untereinheit von Mc. vannielii

(B) 30S Untereinheit von S. solfataricus P1

4. Untersuchungen zur Acidität ribosomaler Proteine von methanogenen Bakterien

Eine charakteristische Eigenschaft der ribosomalen Proteine von Methanbakterien aus der Ordnung Methanobacteriales ist der generell niedrigere pK_1 im Vergleich zum Beispiel mit ribosomalen Proteinen von Mc. vanniellii oder denjenigen von Eubakterien (Douglas et al., 1980; Schmid und Böck, 1981). Zur Klärung der Frage, inwieweit es sich um ein spezifisches Merkmal der ribosomalen Proteine oder generell des Gesamtzellproteins handelt, wurden radioaktiv markierte Gesamtzellextrakte von Mb. thermoautotrophicum und von Mc. vanniellii nach O'Farrell aufgetrennt. Als Markerprotein diente die Pyruvat-Formiat-Lyase von E. coli, die auf O'Farrell Gelen ein sehr markantes, leicht identifizierbares Proteinmuster liefert (Pecher et al., 1982).

Abbildung 15 zeigt deutlich, daß das Gesamtzellprotein von Mb. thermoautotrophicum in der ersten Dimension, der Isoelektrofokussierung, insgesamt weiter zu Anode wandert als Gesamtzellprotein von Mc. vanniellii. Die Acidität des Zellproteins ist ein typisches Merkmal extrem halophiler Bakterien (Strøm und Visentin, 1973; Rao und Argos, 1981), die intern zirka 4 M K^+ -Ionen akkumulieren. Die Proteine dieser Organismen stellen große Anionen dar, die mit dem Salz um das Wasser konkurrieren. Sprott und Jarrell (1981) konnten nachweisen, daß Mb. thermoautotrophicum zirka 1 M K^+ intern akkumuliert, obwohl dieses Bakterium in einem nicht halophilen Biotop vorkommt. Die Acidität der Proteine und die Oligonukleotidanalyse der 16S rRNS (Fox et al., 1980), die die Halobakterien in den Verwandtschaftskreis der Methanobacteriales einreicht, erlauben die Spekulation, daß die Organismengruppe der Methanobacteriales einen halophilen Vorfahren besitzen.

Siehe Abbildung 15





Abbildung 15:

Auftrennung von radioaktiv markiertem Gesamtzellprotein von Mc. vanniellii und Mb. thermoautotrophicum nach O'Farrell (pH-Gradient von 3 bis 10). Der Kreis gibt die Laufposition der Pyruvat-Formiat-Lyase von E. coli an.

II. Immunologischer Vergleich ribosomaler Proteine von Archaeobakterien mit Hilfe der Immunoblotting-Methode

Die immunologische Untersuchung ribosomaler Proteine von Archaeobakterien hatte zum Ziel,

- (i) die Verwandtschaft der Archaeobakterien am Grad der immunologischen Ähnlichkeit der ribosomalen Proteine zu prüfen;
- (ii) die Konservativität der einzelnen ribosomalen Proteine vergleichen zu können.

Vier verschiedene Antiseren wurden generell für die Experimente verwendet: Antiseren gegen ribosomale Untereinheiten von Mb. bryantii, Mc. vanniellii und Saccharomyces cerevisiae wurden in Kaninchen hergestellt. Anti-30S- und Anti-50S-Seren wurden zu Anti-70S-Seren gemischt; über Chromatographie an Sephadex G 150 (Mb. bryantii) oder an DEAE-Cellulose (Mc. vanniellii, Saccharomyces cerevisiae) wurden daraus IgG-Antikörper isoliert. Gereinigte IgG-Antikörper gegen 70S Ribosomen von E. coli, gemischt aus sechs verschiedenen Immunisierungen, wurden von Herrn G. Stöffler, Berlin, zur Verfügung gestellt.

1. Sensitivität und Spezifität der Methode

Die Immunoblotting-Methode hat sich bereits vielfach in der Analyse von Antigengemischen bewährt (Towbin et al., 1979; Renhart et al., 1979; Burnette, 1980; Fahnestock et al., 1981; Böck et al., 1982a, 1982b; Schnabel et al., 1983) und wurde deshalb für den immunologischen Vergleich der ribosomalen Proteine von Archaeobakterien angewendet.

Das Prinzip beruht darauf, daß Antigene in Polyacrylamidgelen - unter nativen oder denaturierenden Bedingungen - aufgetrennt und elektrophoretisch mit Hilfe einer "Blot-Kammer" (BioRad) auf Nitrocellulose transferiert werden. Nach Absättigung des Filters mit Rinderserumalbumin wird er in verdünntem Antiserum inkubiert, dann mehrmals gewaschen und mit ^{125}J markiertem Protein A aus Staphylococcus aureus behandelt. Immunologische Kreuzreaktionen können nach Autoradiographie des Filters festgestellt werden (Abb. 16).

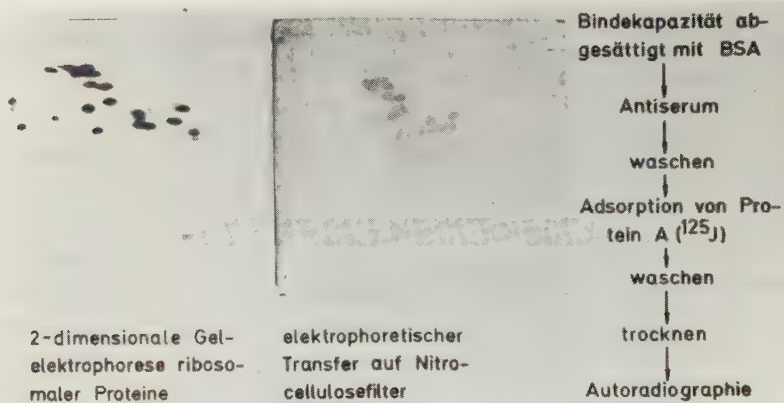


Abbildung 16: Prinzip der Immunoblotting-Methode

Zum Vergleich der Empfindlichkeit des Immunoblottings mit einer klassischen immunologischen Methode sind in Abbildung 17 Immundoppeldiffusionsexperimente mit IgG-Antikörpern gegen 70S Ribosomen von Mb. bryantii gezeigt. Gute Kreuzreaktion dieser IgG-Fraktion wurde mit ribosomalen Proteinen von Mb. bryantii, Mb. thermoautotrophicum und Mbr. arboriphilus

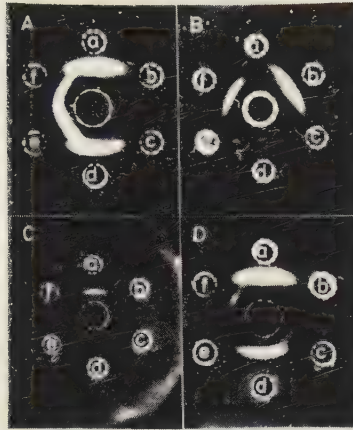


Abbildung 17:

Immundoppeldiffusion von IgG-Antikörper gegen 70S Ribosomen von Mb. bryantii (jeweils im zentralen Loch) und (A): (a) und (d) 6.25 µg TP70 von Mb. bryantii, (b) 75 µg TP70 von Mc. vanniellii, (c) 75 µg TP70 von Ms. barkeri, (e) 75 µg TP70 von Mb. thermoautotrophicum, (f) 75 µg TP70 von Mbr. arboriphilus; (B): (a) 75 µg TP70 von Hb. halobium, (b) 6.25 µg TP70 von Mb. bryantii; (c) 75 µg TP70 von Mc. vanniellii, (d) 75 µg TP70 von Ms. barkeri, (e) 75 µg TP70 von Msp. hungatei, (f) 75 µg TP70 von Mbr. arboriphilus; (C): (a) 75 µg TP70 von Hb. halobium, (b) 75 µg TP70 von E. coli, (c) 75 µg TP80 von Sacch. cerevisiae, (d) 75 µg TP70 von Msp. hungatei, (e) 37.5 µg TP50 von S. solfataricus, (f) 37.5 µg TP30 von S. solfataricus; (D): (a) 6.25 µg TP70 von Mb. bryantii, (b) 75 µg TP70 von Ms. barkeri, (c) 75 µg TP70 von Mc. vanniellii, (d) 75 µg TP70 von Mbr. arboriphilus, (e) 37.5 µg TP30 von Ms. barkeri, (f) 37.5 µg TP50 von Ms. barkeri

erhalten. Schwächere Kreuzreaktionen sind noch zu sehen mit ribosomalen Proteinen von Mc. vanniellii, Ms. barkeri und Hb. halobium. Keine Präzipitationslinie ist dagegen festzustellen mit ribosomalen Proteinen von Msp. hungatei, S. solfataricus, E. coli und von Sacch. cerevisiae. Da keine Spornbildung der Präzipitationslinien von Mb. thermoautotrophicum und Mbr.

arboriphilus und auch von Mc. vanniellii und Ms. barkeri auftritt, scheinen gleiche antigene Determinanten der ribosomalen Proteine konserviert zu bleiben.

Immunpräzipitation und Immunfixierungsexperimente, die im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt worden waren (Schmid und Böck, 1981), erbrachten mit Ausnahme der Kreuzreaktionen mit ribosomalen Proteinen von Hb. halobium die gleichen Ergebnisse.

Wie nachfolgend gezeigt wird, konnte im Gegensatz dazu mit der Immunoblotting-Methode nachgewiesen werden, daß die ribosomalen Proteine aller oben erwähnten Organismen, also auch derjenigen, die in der Immundiffusion ein negatives Resultat erbrachten, noch kreuz-reagierende antigene Determinanten besitzen.

Ein kritischer Punkt jedes immunologischen Vergleiches ist dabei der Nachweis der Spezifität der Reaktionen; es muß gezeigt werden, daß die erhaltenen Kreuzreaktionen nur durch Antikörper entstanden sind, die gegen antigene Determinanten des Immunogens gerichtet sind. Normalerweise verwendet man als Kontrolle "Prä-Immunseren", die vor Immunisierung der Kaninchen gewonnen wurden. Bei Anwendung von "Prä-Immunserum" in Immunoblotting-Versuchen erhielten wir jedoch in einigen Fällen Kreuzreaktionen, die nach Immunisierung des Kaninchens und Wiederholung des Versuches mit dem Immunserum nicht mehr auftraten. Dies machte es erforderlich, für diese empfindliche Methode einen anderen Nachweis für die Spezifität der Reaktionen zu finden.

Hierfür haben wir zwei verschiedene Methoden entwickelt:

- a) Ribosomales Protein des Organismus, gegen das das Antiserum hergestellt wurde, wurde an Silikat-Material gebunden und mit einer geringen Menge der IgG-Fraktion inkubiert. Über eine kleine Säule wurden nichtgebundene

Antikörper abgetrennt und in einem "Spot-Immunoblot"-Experiment wurde auf vollständige Abtrennung der spezifischen Antikörper getestet (Abb. 18). War dies erreicht worden, so wurde dieser Überstand als Kontrollserum für unspezifische Reaktionen in Immunoblotting-Versuchen verwendet.

- b) Eine andere Art zur Herstellung eines Kontrollserums war die Vorinkubation des Antiserums mit denjenigen ribosomalen Untereinheiten, die als Immunogen verwendet wurden. Nach Abzentrifugieren des Präzipitats wurde der Überstand als Kontrollserum in die Immunoblot-Experimente eingesetzt; homologes ribosomales Protein wurde dabei als Antigen mitgeführt.

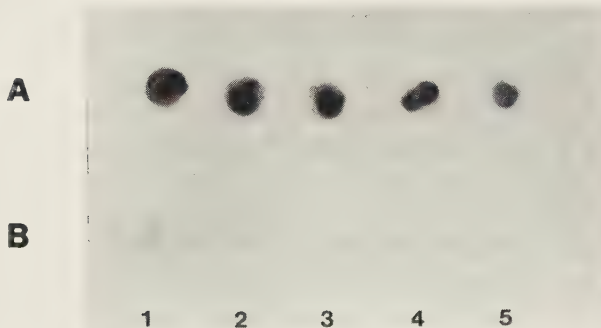


Abbildung 18:

"Spot-Immunoblot" mit Antiserum gegen ribosomale Proteine von *Sacch. cerevisiae* und mit homologem ribosomalen Protein (1 µg).
(A) IgG-Antikörperfraktion (B) Kontrollserum

(A1) 1:100; (A2) 1:500; (A3) 1:1000; (A4) 1:2000; (A5) 1:5000
Verdünnung des Antiserums;
(B1) 1:10; (B2) 1:100; (B3) 1:500; (B4) 1:1000; (B5) 1:2000
Verdünnung des Kontrollserums

Eine deutliche Verbesserung der Spezifität der Reaktionen erbrachte auch die Verwendung eines detergenzhaltigen Puffers (0.2 % SDS; 0.5 % Triton X-100; nach Howe und Hershey, 1981) für die Behandlung der auf Nitrocellulosefilter transferierten Proteine mit Antiserum und Protein A.

2. Immunochemische Evidenzen für konservierte ribosomale Proteine von Archaeobakterien

Eine erste Frage, die mit der geschilderten Immunoblotting-Methode untersucht werden sollte, war, inwieweit ribosomale Proteine innerhalb der Archaeobakterien konserviert bleiben. Ein sehr wichtiges Kriterium für die Analyse war dabei die Qualität der verwendeten Anti-70S-Seren. Um einen Anhaltspunkt über die Anzahl der ribosomalen Proteine zu erhalten, die durch im Serum enthaltene Antikörper erkannt werden, wurde ribosomales Protein, zum Beispiel von Mb. bryantii, zweidimensional aufgetrennt und mit homologem Antiserum im Immunoblot getestet (Abb. 19). Für die vier Antiseren gegen 70S Ribosomen von Mc. vanniellii, Mb. bryantii, Sacch. cerevisiae und E. coli konnte nachgewiesen werden, daß gegen 70% bis 80 % der ribosomalen Proteine des homologen Organismus Antikörper im Serum enthalten waren.

In Abbildung 20 sind die Reaktionen der vier Antiseren mit Protein der ribosomalen Untereinheiten von methanogenen Bakterien und mit TP70 von Hb. halobium dargestellt. Das Antiserum gegen 70S Ribosomen von Mc. vanniellii reagiert mit den ribosomalen Proteinen der übrigen methanogenen Bakterien annähernd gleich gut (Abb. 20A). Auch mit ribosomalen Proteinen von Hb. halobium sind klare Kreuzreaktionen ersichtlich. Die Zahl der kreuz-reagierenden Proteine der untersuchten methanogenen Bakterien ist im Vergleich mit der Zahl der Kreuzreaktionen des homologen Antigens (ribosomales Protein der 30S und 50S Untereinheit von Mc. vanniellii) relativ gering.



Abbildung 19:

Immunoblot-Experimente mit zweidimensional aufgetrennten ribosomalen Proteinen der 30S (A) und 50S (B) Untereinheit von Mb. bryantii und mit einem homologen Antiserum gegen 70S Ribosomen von Mb. bryantii. C und D: Zweidimensionale Elektropherogramme ribosomaler Proteine der 30S (C) und 50S (D) Untereinheit von Mb. bryantii

Antiserum gegen 70S Ribosomen von Mb. bryantii (Abb. 20B) liefert gute Kreuzreaktionen mit ribosomalen Proteinen von Hb. halobium; dieser Befund stützt die Verwandtschaft der Ordnung Methanobacteriales und Halobacteriales, welche aus den 16S rRNS-Oligonukleotiddaten (Fox et al., 1980) und der Acidität der ribosomalen Proteine (siehe Kap. C. I. 4.) gefordert wurde. Gute Reaktionen sind auch mit ribosomalen Proteinen von Mc. vanniellii, Msp. hungatei und Ms. barkeri

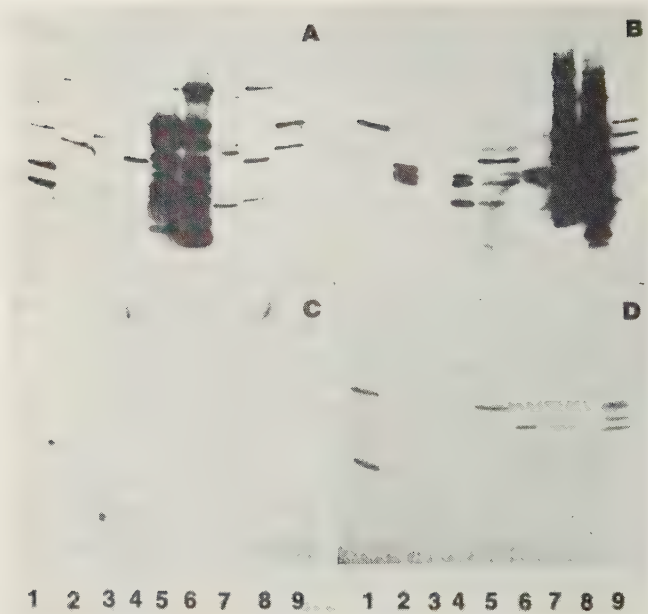


Abbildung 20:

Immunoblot-Experimente mit Antiseren gegen ribosomale Proteine von (A) Mc. vannielii, (B) Mb. bryantii, (C) E. coli und (D) Sacch. cerevisiae. Als Antigen ist im SDS-Gradientengel jeweils aufgetrennt: (1) TP30, (2) TP50 von Ms. barkeri; (3) TP30, (4) TP50 von Msp. hungatei; (5) TP30, (6) TP50 von Mc. vannielii; (7) TP30, (8) TP50 von Mb. bryantii; (9) TP70 von Hb. halobium

zu sehen, wenn auch nur mehr mit wenigen Proteinen. Antikörper, die gegen ribosomale Proteine von E. coli gerichtet sind, erkennen kaum antigene Determinanten ribosomaler Proteine von methanogenen und halophilen Archaeobakterien (Abb. 20C). Dagegen liefert das Immunoblot-Experiment mit dem Antiserum gegen 80S Ribosomen von Sacch. cerevisiae Kreuzreaktionen mit einigen ribosomalen Proteinen sowohl von

methanogenen als auch halophilen Archaeobakterien (Abb. 20D).

Ein analoger immunologischer Vergleich wurde mit ribosomalen Proteinen von "schwefelabhängigen" Archaeobakterien durchgeführt (Abb. 21).

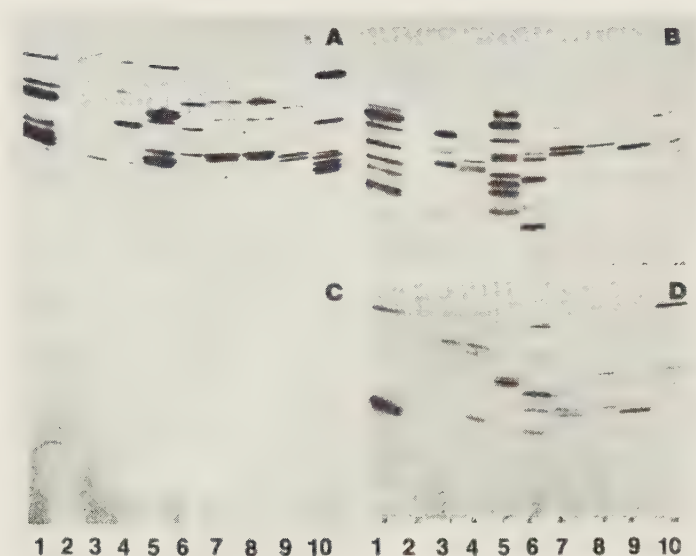


Abbildung 21:

Immunoblot-Experimente mit Antiseren gegen ribosomale Proteine von (A) Mc. vanniellii, (B) Mb. bryantii, (C) E. coli und (D) Sacch. cerevisiae.

Als Antigen ist im SDS-Gradientengel jeweils aufgetrennt:

(1) TP70 von An I, (2) TP30, (3) TP50 von S. solfataricus; (4) TP70 von S. brierleyi; (5) TP70 von Tc. celer; (6) TP70 von D. mobilis; (7) TP70 von Th. tenax; (8) TP70 von Th. neutrophilus; (9) TP70 von Th. H3; (10) TP70 von T. acidophilum

Die Antiseren gegen 70S Ribosomen von methanogenen Bakterien lieferten relativ gute Kreuzreaktionen mit jeweils einigen ribosomalen Proteinen von "schwefelabhängigen" Archaeobakterien. Dabei war ein annähernd identisches Muster der reaktiven Proteine für An I, Tc. celer und T. acidophilum sowie für die drei *Thermoproteus*-Spezies zu erkennen (Abb. 21 A,B). Gleichzeitig wiesen An I, Tc. celer und T. acidophilum die augenscheinlich stärkste Homologie mit ribosomalen Proteinen von methanogenen Bakterien auf. Nach den S_{AB} -Werten nimmt T. acidophilum eine intermediäre Stellung ($S_{AB} = 0.21$; nach Woese et al., 1984) zwischen den Gruppen der methanogenen/halophilen und den "schwefelabhängigen" Archaeobakterien ein. Die immunologischen Daten korrelieren deswegen ausgezeichnet mit den S_{AB} -Werten und würden An I und Tc. celer verwandtschaftlich in die Nähe von T. acidophilum rücken.

Während das Antiserum gegen ribosomale Proteine von E. coli nicht mit ribosomalen Proteinen von "schwefelabhängigen" Archaeobakterien reagierte, wurden mit dem Antiserum gegen 80S Ribosomen von Sacch. cerevisiae Kreuzreaktionen mit diesen erhalten. Mit diesem Antiserum war das Ausmaß der Reaktionen mit ribosomalen Proteinen von "schwefelabhängigen" Archaeobakterien sogar größer als mit ribosomalen Proteinen von Methanbakterien (Abb. 21 C,D).

Vergleicht man die Kreuzreaktionen der ribosomalen Proteine der drei *Thermoproteus*-Arten in Abbildung 21 A und D, so erkennt man, daß die gleichen Proteine sowohl mit dem Anti-70S-Serum von Mc. vannielii als auch mit dem Anti-80S-Serum von Sacch. cerevisiae reagieren.

3. Analyse der Konservativität ribosomaler Proteine von Prokaryonten und einem Eukaryonten mit Anti-70S-Seren

Die bisherigen Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen deuteten auf eine möglicherweise nähere immunologische Ver-

wandtschaft der ribosomalen Proteine von Archaeobakterien mit denjenigen von Sacch. cerevisiae als von E. coli hin. Auch Daten aus der Literatur wie die Aminosäuresequenzhomologie des ribosomalen "A"-Proteins von Mb. thermoautotrophicum und von Hb. halobium mit A-Protein von Eukaryontenribosomen (Matheson et al., 1980), die Anisomycin-Resistenz einiger Archaeobakterien (Elhardt und Böck, 1982; Klink, persönliche Mitteilung), die Ähnlichkeit der Morphologie der 30S Untereinheit von Archaeobakterien mit der 40S Untereinheit von Eukaryonten (Lake et al., 1982) und die Proteinkomplexität der 30S Untereinheit liefern Evidenzen, daß dem archaeobakteriellen Translationsapparat eukaryontische Eigenschaften zukommen.

Ein immunologischer Vergleich der Proteine von Eubakterien, Archaeobakterien und von Sacch. cerevisiae mit den vorher verwendeten vier Anti-70S-Seren (Abb. 20 und 21) sollte weitere mögliche Evidenzen liefern.

Abbildung 22 zeigt das Versuchsergebnis. Die Antiseren gegen 70S Ribosomen von Mc. vanniellii (Abb. 22A) und Mb. bryantii (Abb. 22B) reagierten nur mit wenigen ribosomalen Proteinen von Sacch. cerevisiae und auch im gleichen geringen Ausmaß mit ribosomalen Proteinen von Eubakterien. Die Kreuzreaktion mit Eubakterien beschränkte sich dabei vornehmlich auf ribosomale Proteine im Molekulargewichtsbereich um 25 000 D. Das Antiserum gegen 70S Ribosomen von E. coli (Abb. 22C) lieferte eine gute Homologie der ribosomalen Proteine innerhalb grampositiver und gramnegativer Eubakterien, jedoch ganz schwache Homologie - hauptsächlich eine Bande - mit Archaeobakterien und Sacch. cerevisiae.

Ein ähnliches Bild wurde mit dem Antiserum gegen 80S Ribosomen von Sacch. cerevisiae erhalten (Abb. 22D). Nur sehr schwach wurden antigene Determinanten der ribosomalen Proteine von Archaeobakterien und Eubakterien erkannt.

Die Experimente zeigen außerdem, daß Kreuzreaktionen mit

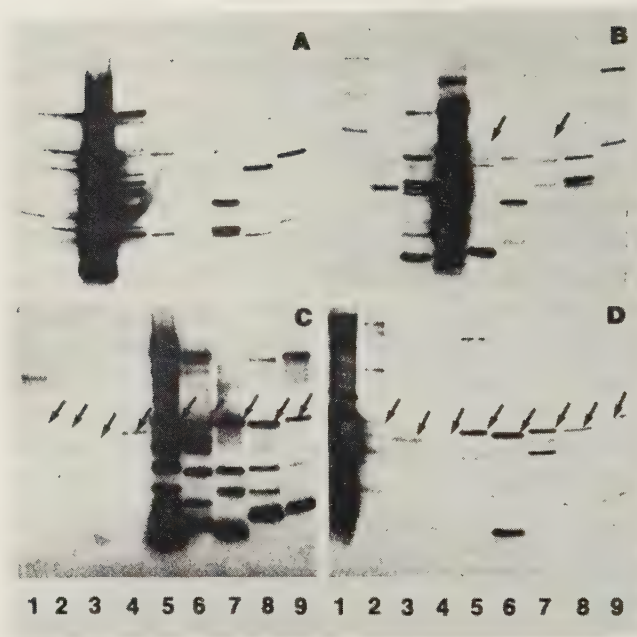


Abbildung 22:

Immunoblot-Experimente mit Antiseren gegen ribosomale Proteine von (A) Mc. vanniellii, (B) Mb. bryantii, (C) E. coli und (D) Sacch. cerevisiae. Als Antigen ist im SDS-Gradientengel jeweils aufgetrennt: (1) TP80 von Sacch. cerevisiae; (2) TP70 von S. solfataricus; (3) TP70 von Mc. vanniellii; (4) TP70 von Mb. bryantii; (5) TP70 von E. coli; (6) TP70 von Ps. aeruginosa; (7) TP70 von C. butyricum; (8) TP70 von Sc. faecalis; (9) TP80 von St. griseus

Proteinen ähnlichen Molekulargewichts bei verschiedenen Organismen erscheinen. Die auffälligste, bei fast allen untersuchten Organismen auftretende Proteinbande ist mit Pfeilen gekennzeichnet. Diese Kreuzreaktion wurde mit drei verschiedenen Antiseren (Abb. 22B,C,D) und mit ribosomalen Proteinen von Vertretern aus allen drei Reichen gefunden (Abb. 22C,D).

Falls die markierten Proteinbanden tatsächlich einem homologen, ribosomalen Protein entsprechen, wären wir mit Hilfe der Immunoblotting-Methode auf ein in der Evolution hoch konserviertes, ribosomales Protein gestoßen.

Um den Beweis für diese Annahme führen zu können, sollte dieses Protein zunächst aus E. coli identifiziert werden. In Abbildung 22D, Spalte 5, sind die Kreuzreaktionen des Antiserums gegen 80S Ribosomen von Sacch. cerevisiae mit ribosomalem Totalprotein von E. coli zu sehen. Die stärkste immunologische Reaktion stellt die markierte Proteinbande dar. Ein Immunoblot-Experiment mit zweidimensional aufgetrenntem ribosomalen Protein von E. coli und dem Antiserum gegen 80S Ribosomen von Sacch. cerevisiae sollte eine Identifizierung dieses Proteins ermöglichen. Wie Abbildung 23 zeigt, ist dies auch gelungen. Die beste Kreuzreaktion wurde

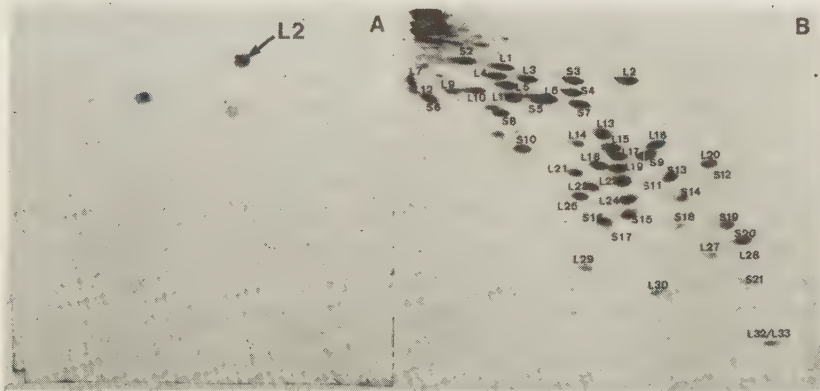


Abbildung 23:

- (A) Immunoblot-Experiment mit zweidimensional aufgetrennten ribosomalen Protein (TP70) von E. coli und mit einem Antiserum gegen 80S Ribosomen von Sacch. cerevisiae
- (B) Zweidimensionales Elektropherogramm ribosomaler Proteine (TP70) von E. coli

mit dem ribosomalen Protein L2 (Nomenklatur nach E. coli) erhalten. Das Molekulargewicht dieses Proteins (29 700 D) entspricht der Wanderungsposition der markierten Proteinbande im SDS-Gel.

4. Untersuchungen mit einem monospezifischen Antiserum gegen das ribosomale Protein L2 von E. coli

a) Konservativität des ribosomalen Proteins L2

Die im vorhergehenden Kapitel geschilderte immunologische Analyse führte zur Entdeckung eines möglicherweise stark konservierten, ribosomalen Proteins. Im Falle von E. coli konnte dieses Protein als das ribosomale Protein L2 identifiziert werden.

Es galt nun nachzuweisen, daß die in Abbildung 22 markierten Banden auf Kreuzreaktionen der Antiseren mit ribosomalen Proteinen, die dem L2-Protein von E. coli homolog sind, zurückzuführen sind. Dies sollte mit Hilfe eines monospezifischen Antiserums gegen das ribosomale Protein L2 von E. coli, das dankenswerterweise von Herrn G. Stöffler, Berlin, zur Verfügung gestellt wurde, erfolgen. In Abbildung 24 sind die Immunoblot-Experimente mit diesem Antiserum und ribosomalen Proteinen einiger Organismen aus den drei Reichen gezeigt. Mit ribosomalem Totalprotein von Eubakterien wurde eine starke Kreuzreaktion erhalten (Abb. 24B; 1-5). Das apparente Molekulargewicht der kreuzreagierenden Proteine war annähernd identisch. Auch mit ribosomalen Proteinen von Vertretern der Methanobacteriales, von Mc. vanniellii, von Sacch. cerevisiae und von P. anserina konnte ein immunologisch ähnliches, ribosomales Protein nachgewiesen werden (Abb. 24A). Das apparente Molekulargewicht der im Immunoblot erscheinenden Proteine war ebenfalls sehr ähnlich.

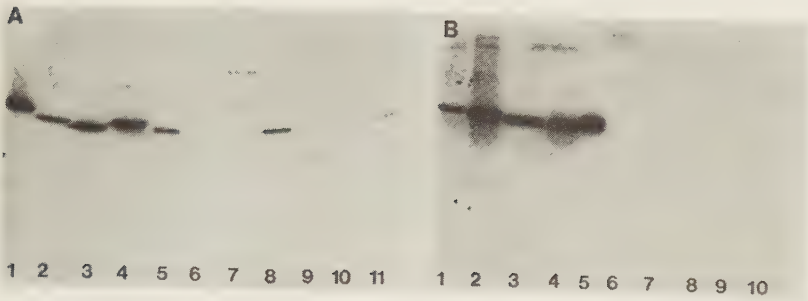


Abbildung 24:

Immunologische Kreuzreaktion eines monospezifischen Antiserums gegen das ribosomale Protein L2 von E. coli und (A): (1) TP50 von E. coli; (2) TP50 von Mb. thermoautotrophicum; (3) TP50 von Mb. bryantii; (4) TP70 von Mb. formicicum; (5) TP50 von Mc. vannielii; (6) TP50 von Msp. hungatei; (7) TP50 von Ms. barkeri; (8) TP60 von Sacch. cerevisiae; (9) TP60 von Rattenleber; (10) TP60 von Hühnerleber; (11) TP80 von P. anserina. (B): (1) TP70 von St. griseus; (2) TP70 von C. butyricum; (3) TP70 von Rps. sphaeroides; (4) TP70 von Ps. aeruginosa; (5) TP50 von E. coli; (6) TP50 von D. mobilis; (7) TP50 von Tc. celer; (8) TP50 von Th. tenax; (9) TP50 von S. acidocaldarius; (10) TP70 von Hb. halobium

Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, daß die gekennzeichneten Proteine in Abbildung 22 hoch konservierte, homologe ribosomale Proteine darstellen. Die Reaktionen mit dem monospezifischen Antiserum beweisen, daß es sich um homologe Proteine des L2-Proteins von E. coli handelt.

Die Homologisierung konnte nicht auf halophile und "schwefelabhängige" Archaeobakterien ausgedehnt werden. Extrem schwache Kreuzreaktionen im entsprechenden Molekulargewichtsbereich erschienen zwar im Immunoblot ribosomaler Proteine von Tc. celer, Th. tenax und S. solfataricus. Diese Resultate konnten aber in zweidimensionalen ribosomalen Proteinauftrennungen nicht eindeutig reproduziert werden. Mit ribosomalen Total-

protein von Rattenleber und Hühnerleber wurde ebenfalls keine immunologische Ähnlichkeit mit dem L2-Protein von E. coli festgestellt.

b) Identifizierung des L2-homologen ribosomalen Proteins in eindimensionalen und zweidimensionalen Elektropherogrammen

Die klaren Kreuzreaktionen, die ribosomale Proteine von Sacch. cerevisiae und von methanogenen Bakterien mit Anti-L2-Serum von E. coli lieferten, erlaubten eine Identifizierung der L2-homologen ribosomalen Proteine in eindimensionalen und zweidimensionalen Elektropherogrammen der entsprechenden Organismen.

In Abbildung 25 sind neben dem L2 von E. coli das homologe ribosomale Protein von Sacch. cerevisiae, Mc. vanniellii und Mb. bryantii gekennzeichnet.

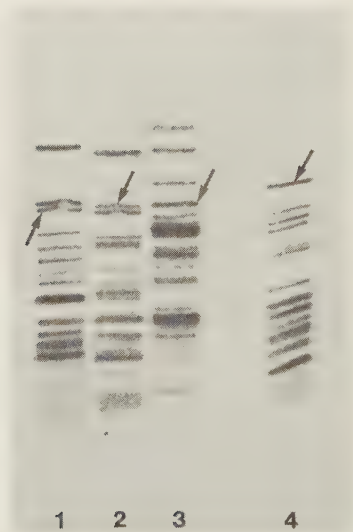


Abbildung 25:

SDS-Gelelektrophorese und blot der Proteine auf Nitrocellulose von (1) TP50 Mb. bryantii, (2) TP50 Mc. vanniellii, (3) TP60 Sacch. cerevisiae und (4) TP50 E. coli (Proteine angefärbt mit Amidoschwarz).

"L2-Proteine" sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Das apparente Molekulargewicht des L2-Äquivalents methanogener Bakterien und von Sacch. cerevisiae ist nahezu identisch, während das L2-Protein von E. coli deutlich größer ist.

In zweidimensionalen Elektropherogrammen besitzen eubakterielle L2-Äquivalente ein charakteristisches Laufverhalten, das auf die große Basizität dieses Proteins zurückzuführen ist. Abbildung 26 zeigt dies für E. coli.

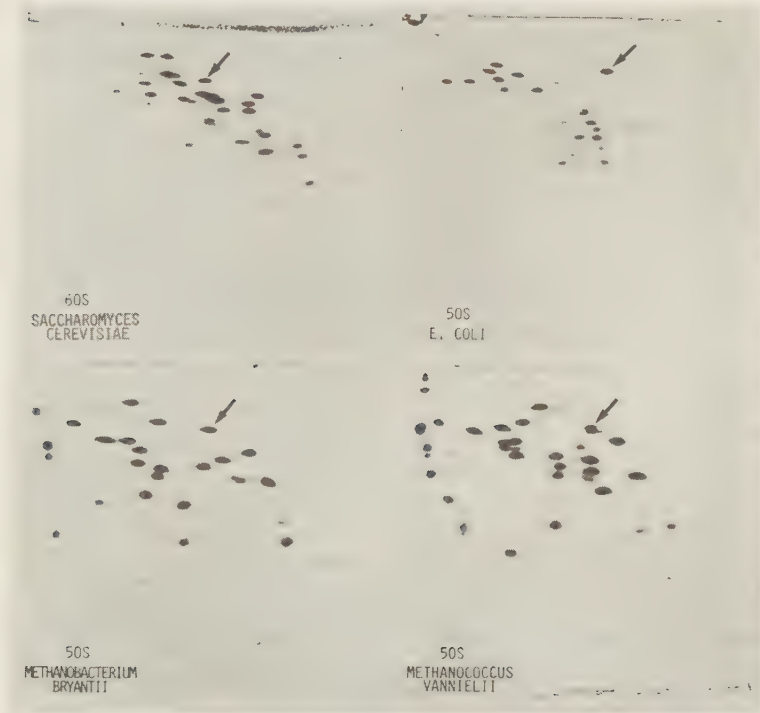


Abbildung 26:

Zweidimensionale Elektropherogramme ribosomaler Proteine. Das L2-Protein von E. coli sowie homologe ribosomale Proteine bei Sacch. cerevisiae, Mb. bryantii und Mc. vannielii sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Ein nicht ganz so basisches Laufverhalten konnte für L2-Äquivalente von Sacch. cerevisiae, Mb. bryantii und Mc. vanniellii nachgewiesen werden (Abb. 26). Sowohl für Sacch. cerevisiae (Otaka und Osawa, 1981) als auch für Mc. vanniellii ist eine Nomenklatur für die ribosomalen Proteine aufgestellt worden; demnach entspricht dem L2-Protein von E. coli das Protein YL6 von Sacch. cerevisiae und das Protein ML7 von Mc. vanniellii.

c) Versuche zur Quantifizierung des Homologiebereiches der L2-äquivalenten Proteine

Um die Größe der für Kreuzreaktion verantwortlichen Homologieregion von L2-Äquivalenten abzuschätzen, wurde ribosomales Gesamtprotein von Vertretern der Eubakterien, der methanogenen Bakterien und von Sacch. cerevisiae mit Cyanbromid gespalten. Ein Vergleich der Spaltprodukte des L2-Proteins, die durch Immunoblotting mit einem Antiserum gegen L2-Protein von E. coli sichtbar gemacht wurden, sollte eine grobe Abschätzung der Homologieregion ermöglichen. Wie eine unvollständige Cyanbromidspaltung in Abbildung 27 zeigt, konnten L2-Spaltprodukte nur gut für Eubakterien nachgewiesen werden. Bei verwandtschaftlich weiter entfernten Organismen war die positive immunologische Reaktion stark reduziert. Das gleiche Resultat wurde auch bei limitierter Proteolyse von L2-Äquivalenten nach Cleveland et al. (1977) dieser Organismen erhalten.

Man kann dieses Ergebnis so interpretieren, daß mehrere antigene Determinanten, an die Antikörper nur mehr mit geringer Affinität binden, in den heterologen Proteinen vorhanden sind. Bei einer Spaltung werden (i) die antigenen Determinanten getrennt und (ii) durch Veränderung der Umgebung der antigenen Determinanten die Affinität zum Antikörper unter Umständen gesenkt.

Abbildung 27 →

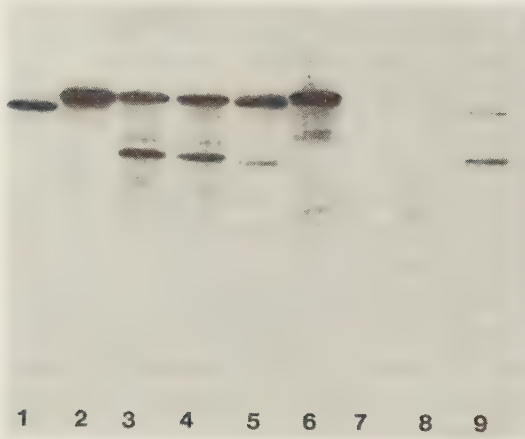


Abbildung 27:

SDS-Gelelektrophorese und Immunblot mit Antiserum gegen das ribosomale Protein L2 von E. coli von (1) TP50 Mb. bryantii; (2) TP50 E. coli; (3) - (9) Cyanbromid gespaltenes TP70 von (3) E. coli; (4) E. coli; (5) Ps. aeruginosa; (6) C. butyricum; (7) Sacch. cerevisiae; (8) Mc. vanniellii; (9) Mb. bryantii

5. Untersuchungen mit anderen monospezifischen Antiseren gegen ribosomale Proteine von E. coli

Eine Analyse der Antibiotikasensitivitäten methanogener Bakterien in einem Poly-U abhängigen in vitro Translationssystem hatte erbracht, daß Thiostrepton, ein typischer Inhibitor des 70S Ribosoms, die Translation an Mc. vanniellii und Mb. formicicum Ribosomen hemmt (Elhardt und Böck, 1982).

An E. coli wurde die Wirkungsweise dieses Antibiotikums relativ gut aufgeklärt (Cundliffe, 1983): Thiostrepton bindet an die L11 Domäne der 50S Untereinheit von E. coli und inhibiert die EF-G abhängige GTPase-Reaktion. Für eine hochaffine Bindung des Antibiotikums ist lediglich ein Komplex aus 23S rRNS

und dem ribosomalen Protein L11 notwendig. 23S rRNS alleine besitzt nur eine schwache Bindestelle für das Antibiotikum (Thompson et al., 1979). Das Protein L11 hat demnach entscheidenden Einfluß auf die richtige Konformation der Antibiotikabindestelle.

Ein Vorhandensein des Wirkortes dieses Antibiotikums bei methanogenen Bakterien könnte auf einer Ähnlichkeit des L11-äquivalenten ribosomalen Proteins mit E. coli L11 beruhen, die sich in einer immunologischen Kreuzreaktion dieses Proteins mit einem Antiserum gegen E. coli L11 manifestieren könnte.

Abbildung 28 demonstriert jedoch, daß mit einem monospezifischen Antiserum gegen das ribosomale Protein L11 von E. coli - ebenfalls von Herrn Stöffler, Berlin - kein homologes Protein bei methanogenen Bakterien gefunden werden konnte.



Abbildung 28:

"Immunoblot" mit einem Antiserum gegen das ribosomale Protein L11 von E. coli.

Als Antigen ist im SDS-Gradientengel aufgetrennt: (1) TP50 E. coli, (2) TP50 Mc. vanniellii, (3) TP60 Sacch. cerevisiae.

Dagegen kreuzreagiert ein ribosomales Protein von Hefe mit deutlich größerem Molekulargewicht als das entsprechende Protein bei E. coli. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung von Juan-Vidales et al. (1983) konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei dem L11 homologen Protein von Sacch. cerevisiae um das Protein YL23 handelt.

Ein sehr stark konserviertes ribosomales Protein in Eubakterien stellt das Äquivalent des Proteins L7/L12 von E. coli dar. In verschiedenen Eubakterien findet man zwischen 60 % und 80 % Aminosäuresequenzhomologie, während die Homologie des L7/L12 Proteins von E. coli mit dem von Eukaryonten auf unter 20 % absinkt (Matheson et al., 1980). Dieses Protein ist sowohl wegen der Morphologie der SOS Untereinheit - es bildet den "L7/L12 stalk" (Strycharz et al., 1978) - als auch wegen seiner Funktion - es vermittelt die Bindung von mehreren Translationsfaktoren (Stöffler und Wittmann, 1977) - äußerst intensiv untersucht worden.

Mit einem Antiserum gegen das Protein L7/L12 von E. coli sowie mit Antiseren gegen ein N-terminales Peptidfragment (Aminosäure 1 bis 73) und ein C-terminales Peptidfragment (Aminosäure 74 bis 120) dieses Proteins sollte die Frage untersucht werden, ob noch immunologische Verwandtschaft zwischen dem L7/L12-Protein von E. coli und dem entsprechenden Protein bei Archaeobakterien gefunden werden kann.

Immunoblotting-Experimente mit diesen Antiseren und mit ribosomalen Proteinen von methanogenen Bakterien und auch von Sacch. cerevisiae veranschaulichten, daß die Ähnlichkeit des Proteins L7/L12, die innerhalb der Eubakterien stark ausgeprägt ist, bei Archaeobakterien und bei Sacch. cerevisiae nicht mehr vorhanden ist (nicht dargestellt). Die Bestimmungen der N-terminalen Aminosäuresequenzen des L7/L12 Äquivalents von Mb. thermoautotrophicum und Hb. halobium (Matheson et al., 1980) korrelieren mit diesen immunologischen Befunden; es

existiert nur geringe Homologie mit der Primärstruktur des E. coli Proteins.

III. Versuche zur Isolierung eines ribosomalen Proteingens

von Mc. vanniellii

1. Untersuchung der Homologie zwischen dem Gen für das L2-Protein von E. coli und dem entsprechenden ribosomalen Proteingen von Mc. vanniellii

Eines der interessantesten Ergebnisse aus den immunologischen Untersuchungen war die große Konservativität des ribosomalen Proteins L2. Da die immunologischen Reaktionen in Gegenwart von 0.2 % SDS und 0.5 % Triton X-100 durchgeführt wurden, kann angenommen werden, daß die immunologischen Kreuzreaktionen auf sequenzspezifische Antikörper zurückzuführen sind. Dies setzt eine Aminosäuresequenzhomologie der L2-homologen Proteine voraus. Wäre diese Sequenzhomologie auch auf Genebene noch in einem Ausmaß vorhanden, daß eine Hybridisierung zwischen dem E. coli L2-Gen und dem entsprechenden ribosomalen Proteingen von Mc. vanniellii stattfindet, so könnte dieses Gen von Mc. vanniellii mit Hilfe des L2-Gens von E. coli als Hybridisierungsprobe isoliert werden.

Eine Klonierung des L2-homologen Proteins von Mc. vanniellii wäre die notwendige Voraussetzung (i) für die DNA-Sequenzierung und die daraus abzuleitende Aminosäuresequenz und (ii) für die Untersuchung der Organisation der ribosomalen Proteingene von Mc. vanniellii.

In Abbildung 29 ist im Schema wiedergegeben, auf welche Weise

Protein L2 - kodiert (Jaskunas et al., 1977). Ein 4.6 % EcoRI-Fragment (= 2.2 kb) (Zengel et al., 1980) wurde in den Vektor pACYC184 kloniert. Durch Restriktionskartierung des Inserts konnte nachgewiesen werden, daß dieses Insert das Gen für das L2-Protein trägt.

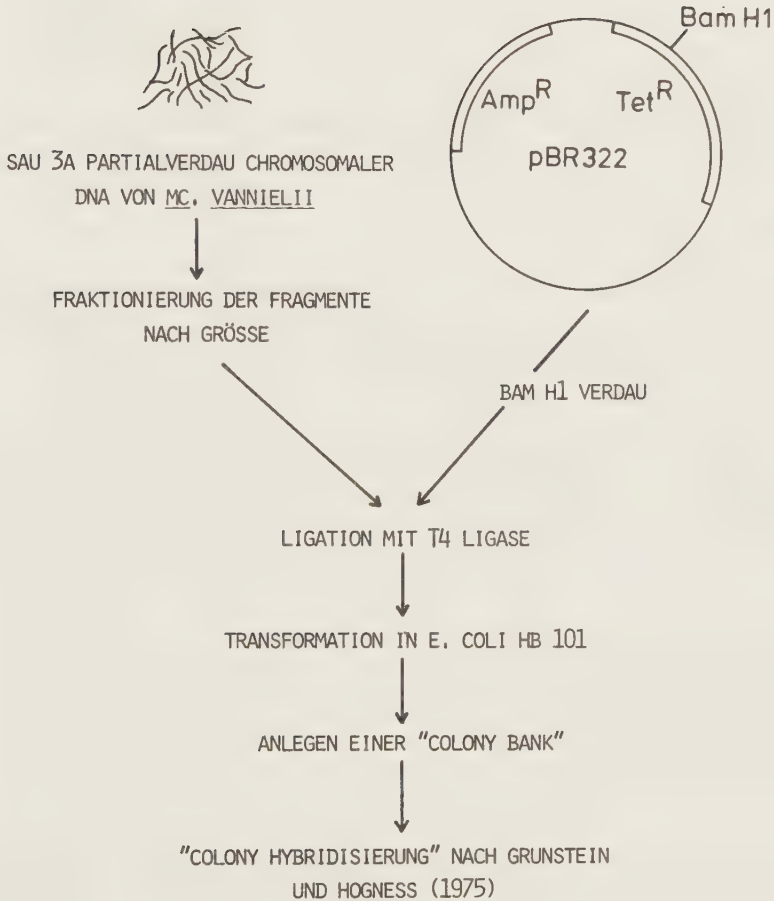
Dieses neu rekombinierte Plasmid als auch das isolierte Insert wurden durch "nick translation" radioaktiv markiert. Chromosomale Gesamt-DNS von Mc. vanniellii wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII, PstI und ClaI verdaut, auf Agarosegelen aufgetrennt und nach "Vakuumbloit" und Denaturierung mit obigen Proben bei 65°C und bei 50°C hybridisiert. Nach achttägiger Autoradiographie mit Verstärkerfolie konnte keine Hybridisierung festgestellt werden.

2. Erstellen einer Koloniebanc von Mc. vanniellii

Da sich herausstellte, daß das L2-Gen von E. coli nicht als Hybridisierungsprobe verwendet werden konnte, sollte nach der in Abbildung 30 gezeigten Strategie zur Klonierung des L2-homologen ribosomalen Proteins von Mc. vanniellii vorgegangen werden. So wurde mit der Herstellung einer Koloniebanc begonnen.

Dazu wurde chromosomale Gesamt-DNS mit dem Restriktionsenzym Sau 3AI partiell verdaut und über Agarosegelelektrophorese in "low melting" Agarose wurden DNS-Fragmente einer Größe von etwa 5 bis 15 kb isoliert. Diese Fragmente wurden in die Bam H1 Schnittstelle des Plasmidvektors pBR 322 kloniert. Der Vektor wurde nach Aufschneiden mit dem Restriktionsenzym Bam H1 mit alkalischer Phosphatase behandelt, um eine Religation zu verhindern (Ullrich et al., 1977). Die Transformation erfolgte in E. coli HB101.

Das Ziel war, sovieler Transformanten mit neu rekombinierten Plasmiden zu isolieren, daß das Genom von Mc. vanniellii



HYBRIDISIERUNGSPROBE: OLIGONUKLEOTIDE KOLINEAR MIT N-TERMINALEN
AMINOSÄURESEQUENZEN RIBOSOMALER PROTEINE VON MC. VANNIELII

Abbildung 30:

Strategie der L2-Klonierung von Mc. vannielii mit synthetischen Oligonukleotiden

statistisch mindestens einmal in der Koloniebanc enthalten ist. Bei einer Annahme, daß die Genomgröße von Mc. vanniellii zirka 1.5×10^6 bp beträgt (Mitchell et al., 1979) und durchschnittlich Fragmente mit 5000 bp kloniert wurden, reichen nach folgender Formel $N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$ a) (Clarke und Carbon, 1976) 1393 Kolonien aus, um 99 % des Genoms von Mc. vanniellii kloniert zu haben. Um sicherzugehen, haben wir 2000 Transformatanten isoliert.

Aus dieser Koloniebanc soll nun über Hybridisierung mit synthetischen Oligonukleotiden ein Plasmid mit dem Gen für das ribosomale Protein ML7 von Mc. vanniellii, das dem L2-Protein von E. coli homolog ist, isoliert werden. Die Sequenz der Oligonukleotide wird aus der N-terminalen Aminosäuresequenz des Proteins ML7 abgeleitet. Derzeit werden N-terminale Aminosäuresequenzen ribosomaler Proteine von Mc. vanniellii in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Wittmann-Liebold, Berlin, erstellt.

a) N: Anzahl der Transformatanten in der Koloniebanc

P: Wahrscheinlichkeit, daß eine bestimmte DNS-Sequenz kloniert worden ist.

f: $\frac{\text{durchschnittliche Größe der Fragmente}}{\text{Genomgröße}}$

D. DISKUSSION

Die Analyse der Proteinstruktur der Ribosomen von Archaeobakterien wurde mit dem Ziel begonnen,

- a) einen Einblick in die Proteinzusammensetzung der Ribosomen dieses dritten biologischen Reiches zu erhalten;
- b) die phylogenetische Stellung der Archaeobakterien über immunologische Untersuchungen an ribosomalen Proteinen zu prüfen;
- c) die Evolution der ribosomalen Proteine per se zu studieren.

Proteinzusammensetzung der Ribosomen von Archaeobakterien

Die Problematik der exakten Bestimmung der Anzahl der Proteine eines Ribosoms mit gelelektrophoretischen Methoden ist äußerst subtil. Sie beginnt bei der Definition eines ribosomalen Proteins. Für unsere Untersuchung wurden folgende Kriterien für die Identifizierung eines ribosomalen Proteins herangezogen:

- das Protein ist Bestandteil einer unter Hochsalzbedingungen gereinigten ribosomalen Untereinheit,
- das Protein erscheint nur bei gelelektrophoretischer Auftrennung von Totalprotein einer einzigen Untereinheit,
- das Laufverhalten des Proteins ist bei verschiedenen Präparationen identisch.

Diese Kriterien sind noch kein sicherer Nachweis, daß die

identifizierten Proteine Bestandteile der Ribosomen von Archaeobakterien sind. Erst detaillierte genetische und proteinchemische Untersuchungen sowie Rekonstitutionen von Untereinheiten würden endgültige Beweise dafür liefern.

Ein weiteres Problem ist die bereits in Kap. C.I.3. angesprochene Frage der Individualität der in zweidimensionalen Gelen benannten ribosomalen Proteine. Die Reelektrophorese der einzelnen Proteine in SDS-Polyacrylamid-Gelen gibt zwar durch das unterschiedliche Laufverhalten fast aller Proteine (bis auf drei oder vier Proteine) einen Anhaltspunkt für deren Individualität. Letztlich wären jedoch auch hierfür Aminosäuresequenzen oder genetische Daten notwendig.

Trotz dieser, der Methode inhärenten Unzulänglichkeiten, konnte für E. coli annähernd die exakte Proteinzahl des Ribosoms ermittelt werden (Kaltschmidt und Wittmann, 1970). Schwieriger erwies sich die Bestimmung der Proteine bei komplexeren eukaryontischen Ribosomen (Wool, 1980).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinzusammensetzung der Ribosomen von Vertretern aller bisher bekannten Ordnungen der Archaeobakterien untersucht (mit Ausnahme der Ordnung Thermoplasmatales).

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse zusammengefaßt und zum Vergleich ist die Anzahl ribosomaler Proteine von zwei Eubakterien und zwei Eukaryonten mit unterschiedlicher phylogenetischer Stellung angeführt.

Der Proteinanteil der Ribosomen von Archaeobakterien läßt sich folgendermaßen charakterisieren:

- (i) Die Proteinzahl der 50S Untereinheit von Archaeobakterien ist nahezu identisch mit der von Eubakterien. Ein deutlicher Unterschied besteht dagegen in der Molekulargewichtsverteilung der Proteine. Das durchschnittliche

Tabelle 5: Anzahl ribosomaler Proteine von Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryonten

Organismen	Zahl der Proteine an			
	30S	50S	beiden Unter- einheiten	70S
<u>Eubakterien</u>				
<i>E. coli</i>	20	32	1	52-53 ^c
<i>B. subtilis</i>	20	32	-	52 ^d
<u>Archaeobakterien</u>				
<i>Mb. thermoautotrophicum</i>	22	32	-	54
<i>Mb. bryantii</i>	23	32	-	55
<i>Mbr. arboriphilus</i>	22	31	1	53-54
<i>Msp. hungatei</i>	21	34	1	55-56
<i>Mc. vanniellii</i>	25	35	2	60-62
<i>Hb. cutirubrum</i>	21	32	-	53 ^e
<i>S. solfataricus</i>	27	34	3	61-64
<i>S. acidocaldarius</i>	27	34	3	61-64
<i>D. mobilis</i>	24	34	-	58
<i>Th. tenax</i>	24	32	-	56
<i>Tc. celer</i>	24	32	-	56
<u>Eukaryonten</u>				
<i>Sacch. cerevisiae</i>	29	44	-	73 ^a
Rattenleber	34	50	-	84 ^a

a) Otake und Osawa, 1981

b) Wool, 1980

c) Kaltschmidt und Wittmann, 1970

d) Higo et al., 1980

e) Strøm und Visentin, 1973

Molekulargewicht der 50S ribosomalen Proteine von Archaeobakterien ist größer als das der Eubakterien (Londei et al., 1982).

- (ii) Die Proteinzahl der 30S Untereinheit von Archaeobakterien ist, obwohl nicht einheitlich, intermediär zwischen eubakteriellem und eukaryontischem Typ. Das durchschnittliche Molekulargewicht der 30S ribosomalen Proteine liegt ebenfalls über dem der Eubakterien (Londei et al., 1982).

Diese Aussage steht im Einklang mit Befunden der Arbeitsgruppen um P. Cammarano, J. Lake und G. Stöffler.

Cammarano und Mitarbeiter analysierten die Ribosomen des thermophilen Archaeobakteriums S. solfataricus (früher Caldariella acidophila), das aufgrund des gleichen Isolierungsstandortes mit S. solfataricus, Stamm P1, höchstwahrscheinlich identisch ist. Sie fanden 28 Proteine für die 30S Untereinheit und 34 Proteine für die 50S Untereinheit und bestätigten somit unsere Ergebnisse (Londei et al., 1982).

Aus Gleichgewichtsgradientenzentrifugation in CsCl von Formaldehyd fixierten ribosomalen Untereinheiten ermittelten sie folgende physikalische Größen:

	Molekulargewicht		Proteinanteil	
	30S	50S	30S	50S
<u>Caldariella acidophila</u>	$1.15 \times 10^6 D$	$1.8 \times 10^6 D$	52 %	37 %
<u>E. coli</u>	$0.87 \times 10^6 D$	$1.65 \times 10^6 D$	38 %	30 %

Demnach ist die 30S Untereinheit von Sulfolobus solfataricus

um zirka 300 000 D schwerer als die von E. coli. Der Unterschied im Molekulargewicht ist auf einen erhöhten Proteinanteil zurückzuführen.

Die größere Komplexität der 30S Untereinheit der Archaeobakterien im Vergleich mit Eubakterien wird weiterhin durch elektronenmikroskopische Untersuchungen von J. Lake und G. Stöffler gestützt.

Im Gegensatz zu Eubakterien besitzt die 30S Untereinheit von Archaeobakterien einen zusätzlichen Anhang ("archaeobacterial bill"), der an der gleichen Position bei eukaryontischen 40S Untereinheiten vorzufinden ist (Abb. 31; Lake et al., 1982).

Elektronenmikroskopisch unterscheidet sich die Morphologie der 50S Untereinheiten von Archaeobakterien und Eubakterien nicht (G. Stöffler, persönliche Mitteilung).



Abbildung 31:

Morphologie der kleinen ribosomalen Untereinheiten von Eubakterien (A), Archaeobakterien (B) und Eukaryonten (C) (nach Lake et al., 1982).

Immunologische Ähnlichkeit ribosomaler Proteine von Archaeobakterien

Die geschilderte Anwendung von Anti-70S-Seren stellt eine erste Analyse zur Verwandtschaft der ribosomalen Proteine von Archaeobakterien untereinander und zu Eubakterien und Eukaryonten dar. Weitergehende Information kann sicher durch Einsetzen monospezifischer Antiseren erhalten werden. Für Eubakterien wurde dies bereits gezeigt (Fahnestock et al., 1981). Dennoch können aus den bisherigen Ergebnissen bereits folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

- (i) Die immunologische Ähnlichkeit der ribosomalen Proteine der untersuchten Organismen korreliert weitgehend mit der Homologie der 16S rRNS. Die drei Ordnungen der methanogenen Bakterien werden zum Beispiel durch S_{AB} -Werte von 0.25 bis 0.30 getrennt, und auch die Homologie der ribosomalen Proteine zwischen Vertretern der drei Ordnungen ist annähernd gleich groß. Vergleichbar ist auch die geringe Ähnlichkeit der ribosomalen Proteine zwischen Eubakterien, Archaeobakterien und Eukaryonten, die nur noch einen gemeinsamen Ähnlichkeitskoeffizienten von 0.1 aufweisen (Fox et al., 1980). Eine anscheinende Diskrepanz ergibt sich aus dem immunologischen Vergleich von methanogenen und "schwefelabhängigen" Archaeobakterien. Der S_{AB} -Wert mit 0.15 ist sehr gering (Woese et al., 1984). Ribosomale Proteine beider Gruppen der Archaeobakterien besitzen jedoch noch eine signifikante Anzahl gemeinsamer antigener Determinanten. Letzteres steht im Einklang damit, daß eine Aminosäuresequenzhomologie von 60 % zwischen dem "A"-Protein von Sulfolobus und dem von Mb. thermoautotrophicum beziehungsweise Hb. halobium gefunden wurde (A. Matheson, persönliche Mitteilung). Als Erklärung für diese Diskrepanz wäre denkbar, daß die RNS thermophiler Organismen im Gegensatz zu ribosomalen Proteinen einer

anderen Mutationsrate als die mesophiler Bakterien unterliegt. Der stärkere Selektionsdruck durch Thermophilie auf die RNS könnte in der Struktur erhaltenden Funktion der RNS begründet sein (Thompson und Hearst, 1983).

- (ii) Die signifikante immunologische Ähnlichkeit ribosomaler Proteine von methanogenen und "schwefelabhängigen" Bakterien stützt die Zusammenfassung der beiden Gruppen zum Reich der Archaeobakterien.
- (iii) Die Variabilität der einzelnen ribosomalen Proteine ist unterschiedlich. Am deutlichsten zeigt sich, daß die ribosomalen Proteine unterschiedlich stark konserviert bleiben, wenn die Kreuzreaktionen ribosomaler Proteine von Eubakterien mit dem Antiserum gegen 70S Ribosomen von E. coli verglichen werden (Abb. 22C).

Es kann angenommen werden, daß es sich dabei um homologe Proteine handelt, die diese Konservativität zeigen. Für L2-äquivalente Proteine (Nomenklatur nach E. coli) wurde dies in der vorliegenden Arbeit gezeigt. Die starke Kreuzreaktion eines ribosomalen Proteins aller getesteten Eubakterien mit Molekulargewicht um etwa 10 000 D deutet auf L7/L12-äquivalente Proteine ("A"-Proteine) hin; denn Aminosäuresequenzanalysen dieser Proteine aus Eubakterien lieferten 60 % bis 80 % Homologie (Matheson et al., 1980) und lassen eine gute immunologische Ähnlichkeit erwarten.

Die Variabilität eines ribosomalen Proteins scheint eng mit seiner Rolle für Struktur und Funktion des Ribosoms verknüpft zu sein. Protein L7/L12, zum Beispiel von E. coli, besitzt eine wichtige strukturelle Aufgabe in der Bildung des "L7/L12-stalks" und ebenfalls eine essentielle, funktionelle Aufgabe in der Bindung

von Translationsfaktoren.

- (iv) Ein Unterschied der immunologischen Ähnlichkeit ribosomaler Proteine von Archaeobakterien zu ribosomalen Proteinen von Eubakterien oder von Eukaryonten kann nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ribosomale Proteine von methanogenen und vor allem von "schwefelabhängigen" Archaeobakterien reagieren mit dem Antiserum gegen 80S Ribosomen von Sacch. cerevisiae besser als mit dem Antiserum gegen 70S Ribosomen von E. coli (Abb. 20, 21). Vergleicht man jedoch die Rückreaktionen von Antiseren gegen 70S Ribosomen von methanogenen Bakterien mit ribosomalen Proteinen von Eubakterien, so findet man einige Kreuzreaktionen ebenso wie mit ribosomalen Proteinen von Sacch. cerevisiae. Möglicherweise ist der spezifische Antikörpertiter des Antiserums gegen 70S Ribosomen von E. coli geringer als derjenige der anderen drei Antiseren.

Das L2-Protein

Der Vorteil der Immunoblotting-Methode, einzelne Komponenten eines Antigengemisches immunologisch analysieren zu können, führte zur Entdeckung eines hoch konservierten, ribosomalen Proteins. Immunoblotting zweidimensional aufgetrennter ribosomaler Proteine von E. coli mit Antiserum gegen 80S Ribosomen von Sacch. cerevisiae ergab, daß das konservative Protein das L2-Protein von E. coli darstellen könnte. Der endgültige Nachweis für die herausragende Konservativität des L2-Proteins wurde mit einem monospezifischen Antiserum gegen dieses Protein von E. coli erzielt. Mit diesem Antiserum wurden L2-homologe Proteine nicht nur in Eubakterien (siehe auch Dorne et al., 1984), sondern auch in Archaeobakterien und niederen Eukaryonten gefunden. Die immunologische Ähnlichkeit dieses Proteins ist demnach noch in allen drei Reichen erhalten geblieben. Eine Identifizierung L2-homologer, riboso-

malen Proteine konnte von Mb. bryantii, Mc. vanniellii und Sacch. cerevisiae in eindimensionalen SDS-Gelen und in zweidimensionalen Elektropherogrammen durchgeführt werden. In zweidimensionalen Auftrennungen zeigen diese Proteine ein charakteristisches, basisches Laufverhalten. Vergleichbarer isoelektrischer Punkt, ähnliches Molekulargewicht und immunologische Ähnlichkeit sind Kennzeichen für die Konservativität dieses Proteins.

CNBr-Spaltung des L2-homologen Peptids von Sacch. cerevisiae und von methanogenen Bakterien ergab, daß die Affinität der L2-Antikörper von E. coli zu diesen Proteinen deutlich geringer war als die zu eubakteriellen Homologen. Darauf könnte auch beruhen, daß in ribosomalen Proteinen von Vertretern der Methanomicrobiales, von Halobakterien, "schwefelabhängigen" Archaeobakterien und höheren Eukaryonten kein L2-Protein identifiziert werden konnte. Ein geringer Sequenzunterschied könnte nämlich bereits zur Folge haben, daß die Affinität der L2-Antikörper nicht mehr ausreicht, um eine Kreuzreaktion zu erreichen.

Die Konservativität des L2-Proteins läßt eine essentielle Funktion in der Translation vermuten. "Affinity-labelling" und Rekonstitutionsexperimente mit Ribosomen von E. coli weisen auch das L2-Protein als möglichen Bestandteil des Peptidyltransferase-Zentrums aus (Sonnenberg et al., 1973; Oen et al., 1973; Nierhaus, 1980; Schulze und Nierhaus, 1982). "Crosslinking" ribosomaler Proteine von E. coli lokalisieren das L2-Protein unterhalb der zentralen Protuberanz der 50S Untereinheit (Abb. 32; Traut et al., 1983).

In dieser Region wird auch das Peptidyltransferase-Zentrum angenommen, da hier die Antibiotika Puromycin und Chloramphenicol binden. Beide Antibiotika interferieren mit der Peptidyltransferase-Reaktion (Wittmann, 1983). Zusätzlich zur wichtigen Funktion scheint das L2-Protein auch von struktureller Bedeutung zu sein. L2 bindet nämlich an 23S rRNS

(Tischendorf et al., 1973) und wird in der frühen Phase des Ribosomen-"assembly"-Prozesses benötigt (Nierhaus, 1980).



Abbildung 32:

Profil der 50S Untereinheit von *E. coli* nach Stöffler-Meilicke et al., 1983; funktionelle und strukturelle Domänen nach Wittmann (1983) und Traut et al. (1983)

Die genannten Eigenschaften charakterisieren das L2-Protein als ein unter Umständen der 16S rRNS äquivalentes, interessantes Objekt für phylogenetische Untersuchungen. Der schnellste Weg zu vergleichbaren L2-Proteinsequenzen würde dabei über die entsprechenden Gene führen. Erste Versuche zur Isolierung eines archaebakteriellen L2-Proteingens wurden

unter Verwendung des L2-Gens von E. coli als Hybridisierungsprobe unternommen. Da auf DNA-Ebene keine Homologie festgestellt werden konnte, soll nun aus einer Koloniebanc von klonierter DNS von Mc. vannielii in E. coli mit synthetischen Oligonukleotiden, die N-terminalen Sequenzen des ML7 Proteins von Mc. vannielii kolinear sind, das Gen für das L2-homologe Protein von Mc. vannielii isoliert werden.

Überlegungen zur Phylogenie der Archaeobakterien

Stellt man die Ergebnisse aus dieser Arbeit zu bereits bekannten taxonomischen Merkmalen der Archaeobakterien (Abb. 33), so ist zu sehen, daß zwar weitere Mosaiksteine für ein Gesamtbild beigetragen wurden, daß aber noch keine detaillierten phylogenetischen Zusammenhänge erkannt werden können. Schwierigkeiten bereiten dabei das gleichzeitige Auftreten von typisch eubakteriellen und eukaryontischen Merkmalen bei Archaeobakterien. Horizontaler Gentransfer während der frühen Evolution liefert hierfür die wohl noch wahrscheinlichste Erklärung. Eine zusätzliche Erschwernis liegt in der Heterogenität der Eigenschaften innerhalb der Archaeobakterien, was einen polyphyletischen Ursprung dieser Gruppe nicht ausschließt.

Vorschläge zur Genealogie der drei Entwicklungslinien, die hauptsächlich auf einem taxonomischen Merkmal basieren, sind bereits publiziert worden (Fox et al., 1980; Hori und Osawa, 1980; Zillig et al., 1984).

Allen Modellen fehlt bisher die feine Auflösung, die die Vielfalt der Merkmale integriert. Erst Gesamtsequenzen mehrerer stark konservativer Makromoleküle - wie zum Beispiel 16S, 23S rRNS, L2-Protein und Untereinheiten der RNS-Polymerase - werden wohl die Rekonstruktion der frühen Evolution ermöglichen.

Abbildung 33:

Zusammenstellung taxonomischer Merkmale von Archaeobakterien in Relation zu Eubakterien und Eukaryonten

	EUKARYONTEN	SCHWEFELAB- HÄNGIGE	METHANOGENE	EUBAKTERIEN
Proteinzahl	30S			
des Ribosoms	50S			
-Immunologische Ähn- lichkeit von ribo- somalen Proteinen				
-Molekulargewichte der r-Proteine				
-16S rRNS-Sequenz				
-"Extra 5S rRNS" in trNS Operon				
-Zellwand				
-Ätherlipide				
'A'-Proteinsequenz				
Diphtherietoxin- sensitivität				
Anisomycin, Neomycin ^a				
"archaeobacterial bill"				
RNS-Polymerase				
Größe der RNS, rRNS- Operon Organisation, trNA im Spacer zwischen 16S und 23S, Anti-Shine- Dalgarno-Sequenz ^b				
Thiostrepton				
Chloramphenicol ^c				
Streptomycin				
Cycloheximid ^c				

a) Böck et al., 1983; b) Steitz, 1978; c) Elhardt und Böck, 1982;
Schmid et al., 1982

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchungen der Primärstruktur ribosomaler RNS führten zur ersten Erstellung eines phylogenetischen Systems für Prokaryonten und zur Entdeckung der Archaeobakterien (Fox et al., 1980; Hori und Osawa, 1980).

Die Kenntnis der Proteinstruktur archaeobakterieller Ribosomen sollte weitere taxonomische Kriterien für die Stellung der Archaeobakterien in der Evolution liefern und auch als Grundlage für funktionelle Studien am Archaeobakterienribosom dienen.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse der biochemischen, immunologischen und genetischen Analyse des Proteinanteils des Archaeobakterienribosoms lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Elf Spezies aus den fünf phylogenetischen Hauptgruppen der Archaeobakterien wurden auf die Proteinzusammensetzung ihrer Ribosomen untersucht:
 - a) Die 30S Untereinheit erwies sich als heterogen in der Proteinkomplexität. Generell konnten jedoch etwas mehr ribosomale Proteine als bei eubakteriellen 30S Untereinheiten gefunden werden.
 - b) Die Proteinzahl der 50S Untereinheit ist typisch eubakteriell. Signifikante Unterschiede zu Eubakterien bestehen im durchschnittlich höheren Molekulargewicht der Proteine.
2. Ribosomale Proteine von Vertretern aus der Ordnung Methanobacteriales zeigten in zweidimensionalen Elektrophogrammen ein für ribosomale Proteine unübliches acids

Laufverhalten. Isoelektrofokussierung von Gesamtzellprotein von Mb. thermoautotrophicum erbrachte den Nachweis, daß der durchschnittliche pK_i aller Proteine niedriger ist als derjenige der Proteine von Mc. vanniellii. Die Acidität der Proteine von Mb. thermoautotrophicum scheint mit der hohen internen K^+ -Ionenkonzentration zu korrelieren (Sprott and Jarrell, 1982). Dieses Phänomen ist typisch für extrem halophile Archaeobakterien und spricht für die Existenz eines gemeinsamen halophilen Vorfahren von Halobakterien und den Spezies aus der Ordnung Methanobacteriales.

3. Die Immunoblottinganalyse ribosomaler Proteine von Archaeobakterien mit Antiseren gegen ribosomale Protein von Mb. bryantii, Mc. vanniellii, Sacch. cerevisiae und E. coli ergab folgende Befunde:
 - a) Gute Kreuzreaktionen wurden erhalten innerhalb der methanogenen/halophilen Gruppe. Sie waren vergleichbar mit den Verwandtschaftsbeziehungen, die aus den 16S rRNS Oligonukleotiddaten abgeleitet wurden.
 - b) Eine signifikante immunologische Verwandtschaft der ribosomalen Proteine von methanogenen und "schwefelabhängigen" Archaeobakterien konnte festgestellt werden.
 - c) Eine im Vergleich dazu nur geringe Homologie der ribosomalen Proteine war unter den Vertretern der drei Entwicklungslinien festzustellen.
 - d) Ein in allen drei Reichen stark konserviertes ribosomales Protein wurde entdeckt; es entspricht dem Protein L2 von E. coli.
4. Auf DNS-Ebene konnte über Hybridisierung die Homologie der immunologisch kreuzreagierenden L2-Proteine von Mc. vanniellii und E. coli nicht nachgewiesen werden. Eine Klonierung des

Mc. vanniellii L2-Gens mit dem E. coli L2-Gen als Hybridisierungsprobe war somit nicht möglich. Durch Anwendung von synthetischen Oligonukleotiden, deren Sequenz von der N-terminalen Aminosäuresequenz des L2-homologen Proteins von Mc. vanniellii abgeleitet wird, soll als nächstes Vorhaben über Koloniehybridisierung das L2-Gen von Mc. vanniellii isoliert werden.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Balch WE, Wolfe RS (1976) Appl Environ Microbiol 32: 781-791
- Böck A, Wirth R, Schmid G, Schuhmacher G, Lang G, Buckel P (1983) FEMS Microbiol Lett 20: 135-139
- Böck A, Wirth R, Schmid G, Schuhmacher G, Lang G, Buckel P (1983) FEMS Microbiol Lett 20: 141-144
- Böck A, Bär U, Schmid G, Hummel H (1983) FEMS Microbiol Lett 20: 435-438
- Brock TD, Brock KM, Belley RT, Weiss RL (1972) Arch Mikrobiol 84: 54-68
- Burnette WN (1981) Anal Biochem 112: 195-203
- Campell DH, Gorvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH (1970) Methods of Immunology, 2. Auflage, W.A. Benjamin Inc., New York
- Chang ACY, Cohen SN (1978) J Bacteriol 134: 1141-1156
- Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli KK (1977) J Biol Chem 252: 1102-1106
- Clewell DB, Helinski DR (1969) Proc Natl Acad Sci USA 62: 1159-1166
- Cohen SN, Chang ACY, Hsu L (1977) Proc Natl Acad Sci USA 69: 2110-2114
- Cundliffe E (1983) In: Edwards DI, Hiscock DR (eds) Chemotherapeutic Strategy. Macmillian Press, London

- Denhardt D (1966) Biochem Biophys Res Commun 23: 641-646
- Dorne AM, Eneas-Filko J, Heizmann P, Mache P (1984) Mol Gen Genet 193: 129-134
- Douglas C, Achatz F, Böck A (1980) Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig C1: 1-11
- Elhardt D, Böck A (1982) Mol Gen Genet 188: 128-134
- Fahnestock RS, Strycharz WA, Marquis DM (1981) J Biol Chem 256: 10111-10116
- Falkenstein J (1979) Zulassungsarbeit Universität Regensburg
- Ferry JG, Wolfe RS (1977) Appl Environ Microbiol 34: 371-376
- Fox GE, Pechman KR, Woese CR (1977a) Int J System Bact 27: 44-57
- Fox GE, Magrum LJ, Balch EW, Wolfe RS, Woese CR (1977b) Proc Natl Acad Sci USA 74: 4537-4541
- Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff J, Dryer TA, Wolfe RS, Balch WE, Tanner RS, Magrum RJ, Zablen LB, Blakemore R, Gupta R, Bonen L, Lewis JB, Stahl AD, Luehrsen KR, Chen KN, Woese CR (1980) Science 209: 457-463
- Fox GE, Luehrsen KR, Woese CR (1982) Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig C3: 330-345
- Geisser M, Tischendorf GW, Stöffler G, Wittmann HG (1973a) Mol Gen Genet 127: 111-128

- Geisser M, Tischendorf GW, Stöffler G (1973b) Mol Gen Genet 127: 129-145
- Geyl D, Böck A, Isono K (1981) Mol Gen Genet 181: 309-312
- Gupta R, Woese CR (1980) Curr Microbiol 4: 245-249
- Gupta R, Lauter JM, Woese CR (1983) Science 221: 656-659
- Hardy SHS, Kurland CG, Voynow P, Mora G (1969) Biochemistry 8: 2897-2905
- Higo K, Itoh T, Kumazaki T, Osawa S (1980) In: Osawa S, Ozeki H, Uchida H, Yura T (eds) Genetics and evolution of RNA polymerase, tRNA and ribosomes. University of Tokyo Press, Tokyo
- Hori H, Osawa S (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76: 381-385
- Howe JG, Hershey JWB (1981) J Biol Chem 256: 12836-12839
- Huet J, Schnabel R, Sentenac A, Zillig W (1983) EMBO Journal 2: 1291-1294
- Jarsch M, Altenbuchner J, Böck A (1983) Mol Gen Genet 189: 41-47
- Jarsch M, Böck A (1983) Nucl Acids Res 11: 7537-7544
- Juan-Vidales F, Sanchez Madrid F, Saeuz-Robles MT, Ballesta JPG (1983) Eur J Biochem 136: 275-281
- Kaine BP, Gupta R, Woese CR (1983) Proc Natl Acad Sci USA 80: 3309-3312

- Kaltschmidt E, Wittmann HG (1970) Proc Natl Acad Sci (Wash.)
67: 1276-1282
- Kandler O (1979) Naturwissenschaften 66: 95-105
- Kessel M, Klink F (1981) Eur J Biochem 114: 481-486
- Kimura M, Mende L, Wittmann-Liebold B (1982) FEBS Lett 149:
304-312
- Klein RD, Selsing E, Weels RD (1980) Plasmid 3: 88-91
- König H, Kandler O (1979) Arch Microbiol 121: 271-275
- Kramer G, Henderson AB, Graukowski N, Hardesty B (1980) In:
Chambliss G, Craven GR, Davies J, Davies K, Kahan L,
Nomura M (eds) Ribosomes, Structure, Function and Genetics.
University Park Press, Baltimore p. 825-845
- Laemmli UK (1970) Nature 227: 680-685
- Lake JA, Henderson E, Clark MW, Matheson AT (1982) Proc Natl
Acad Sci USA 79: 5948-5952
- Langworthy TA (1977) Biochim Biophys Acta 487: 37-50
- Langworthy TA, Tornebene TG, Holzer G (1982) Zbl Bakt Hyg I.
Abt Orig C3: 228-244
- Londei P, Teichner A, Cammarano P (1982) Biochem J 209: 461-
470
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Forv AC, Randall RJ (1951) J Biol
Chem 193: 265-275

- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Matheson AT, Möller W, Amous R, Yaguchi M (1980) In: Chambliss G, Craven GR, Davies J, Davies K, Kahan L, Nomura M (eds) Ribosomes, Structure, Function and Genetics, University Park Press, Baltimore p. 297-332
- Mescher MF, Strominger JL (1976) J Biol Chem 251: 2005-2014
- Mets LJ, Bogorad L (1974) Anal Biochem 57: 200-210
- Michel H, Neugebauer D-Ch, Oesterhelt D (1980) In: Baumeister W, Vogell W (eds) Electron Microscopy at Molecular Dimensions, Berlin Springer 1980 p. 27-35
- Mitchell RM, Loeblich LA, Klotz LC (1979) Science 204: 1082-1084
- Neumann H, Gierl A, Tu J, Leibrock J, Staiger D, Zillig W (1983) Mol Gen Genet 192: 66-72
- Oen H, Pellegrini M, Eilat D, Cantor CR (1973) Proc Natl Sci USA 70: 2799-2803
- O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH (1977) Cell 12: 1133-1137
- Otaka E, Osawa S (1981) Mol Gen Genet 187: 370-374
- Otaka E, Higo K, Osawa S (1982) Biochemistry 21: 4545-4550
- Ouchterlony Ø (1968) Handbook of Immunodiffusion and Immunoelectrophoresis, Ann Arbor Sci Publ, Ann Arbor Michigan
- Peacock AC, Dingman CW (1968) Biochemistry 7: 111-118

- Pecher A, Blaschkowski HP, Knappe K, Böck A (1982) Arch Microbiol 132: 365-371
- Perferoen M, Huybrechts R, De Loof A (1982) FEBS Lett 145: 369-372
- Pichon J, Marvaldi J, Morchis-Mouren G (1979) Mol Gen Genet 171: 307-316
- Piepersberg A, Hennecke H, Engelhard M, Nass G, Böck A (1975) J Bacteriol 124: 1482-1488
- Rao JKM, Argos P (1981) Biochemistry 20: 6536-6543
- Renhardt J, Reiser J, Stark GR (1979) Proc Natl Acad Sci (USA) 76: 3116-3120
- Schaffner M (1976) Cell 8: 471-478
- Schmid G, Böck A (1981) J Bacteriol 147: 282-288
- Schmid G, Pecher T, Böck A (1982) Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig C3: 209-217
- Schnabel R, Thomm M, Gerardy-Schalm R, Zillig W, Stetter KO, Huet J (1983) EMBO J 2: 751-755
- Schrenk WJ, Weisberg RA (1975) Mol Gen Genet 137: 101-107
- Schulze H, Nierhaus KH (1982) EMBO J 5: 609-613
- Sogin SJ, Sogin ML, Woese CR (1972) J molec Evol 1: 173-184
- Sonnenberg N, Wilchele M, Zamir A (1973) Proc Natl Acad Sci USA 70: 1423-1426

- Sprott GD, Jarrell KF (1981) *Canad J Microbiol* 27: 444-451
- Steber J, Schleifer KH (1975) *Arch Microbiol* 105: 173-177
- Steitz JA (1978) *Nature* 273: 10
- Stöcklein W, Piepersberg W (1980) *Current Genetics* 1: 177-183
- Stöffler G, Wittmann HG (1971) *Proc Natl Acad Sci (USA)* 68: 2283-2287
- Stöffler G (1974) In: Nomura M, Tissières A, Lengyel P (eds) *Ribosomes*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory p. 615-667
- Stöffler G, Wittmann HG (1977) In: Weissbach H, Pestka A (eds) *Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis*, Academic Press, New York p. 117-202
- Stöffler-Meilicke M, Noah M, Stöffler G (1983) *Proc Natl Acad Sci (USA)* 80: 6780-6784
- Stöffler-Meilicke M, Epe B, Wolley P, Lotti M, Littlechild J, Stöffler G (1984) *Mol Gen Genet* - in press
- Strøm AR, Visentin LP (1973) *FEBS Lett* 37: 274-280
- Strøm AR, Hasnain S, Smith N, Matheson AT, Visentin LP (1975) *Biochim Biophys Acta* 383: 325-337
- Strycharz W, Nomura M, Lake JA (1978) *J Mol Biol* 126: 123-140
- Sturm S, Schönefeld V, Zillig W, Janekovic D, Stetter KO (1980) *Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig C1*: 12-25

- Southern EM (1975) J Mol Biol 98: 503-517
- Subramanian AR, Steinmetz A, Bogorad L (1983) Nucl Acids Res 11: 5277-5286
- Taylor KA, Deatherage JF, Amos LA (1982) Nature 299: 840-842
- Thompson JF, Hearst JE (1983) Cell 33: 19-24
- Tischendorf GW, Geisser M, Stöffler G (1973) Mol Gen Genet 127: 147-156
- Tornebene TG, Langworthy TA (1979) Science 203: 51-53
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354
- Traut RR, Lambert JM, Kenny JW (1983) J Biol Chem 258: 14592-14598
- Tu J, Prangishvilli D, Huber H, Wildgruber G, Zillig W, Stetter KO (1982) J Molec Evol 18: 109-114
- Ullrich A, Shine J, Chirwin J, Pictet R, Tischer E, Rütter WJ, Goodman HM (1977) Science 196: 1313-1319
- Wirth R, Buckel P, Böck A (1977) FEBS Lett 83: 103-106
- Wittmann HG (1982) Ann Rev Biochem 51: 155-183
- Wittmann HG (1983) Ann Rev Biochem 52: 35-65
- Woese CR, Fox GE (1977) Proc Natl Acad Sci USA 74: 5088-5090
- Woese CR, Magrum C, Fox GE (1978) J Molec Evol 11: 245-252

- Woese CR (1982) Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig C3: 1-17
- Woese CR, Gutell R, Gupta R, Noller HF (1983) Microbiol Rev
47: 621-699
- Woese CR, Gupta R, Hahn CM, Zillig W, Tu J (1984) System
Appl Microbiol 5 - in press
- Wolin EA et al. (1963) J Biol Chem 238: 2882
- Wool IG (1979) Ann Rev Biochem 48: 719-754
- Wool IG (1980) In: Chambliss G, Craven GR, Davies J, Davies
K, Kahan L, Nomura M (eds) Ribosomes, Structure, Function
and Genetics. University Park Press, Baltimore p. 797-824
- Yamazaki (1982) J Biol Chem 257: 7926-7929
- Yates JL, Arfsten AE, Nomura M (1980) Proc Natl Acad Sci
USA 77: 1837-1841
- Zengel JM, Mueckl D, Lindahl L (1980) Cell 21: 523-535
- Zillig W, Stetter KO, Tobien M (1978) Eur J Biochem 91: 193-
199
- Zillig W, Tu J, Holz I (1981a) Nature 293: 85-86
- Zillig W, Stetter KO, Schäfer W, Janekovic D, Wunderl S,
Holz I, Palm P (1981b) Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig C2: 205
227
- Zillig W, Stetter KO, Schnabel R, Mandon J, Gierl A (1982)
Zbl Bakt Hyg I. Abt Orig C3: 218-227

Zillig W, Gierl A, Schreiber G, Wunderl S, Janekovic D,
Stetter KO, Klink HP (1983a) System Appl Microbiol 4:
79-87

Zillig W, Holz J, Janekovic D, Schäfer W, Reiter WD (1983b)
System Appl Microbiol 4: 88-94

Zillig W, Schnabel R, Stetter KO (1984) In: Current Topics
in Microbiology - in press

Zuckerkindl E, Pauling L (1965) J Theoret Biol 8: 357-366

Herrn Professor Dr. A. Böck danke ich für die anregenden Diskussionen und Ratschläge zu dieser Arbeit.

Besonders bedanke ich mich für die intensive wissenschaftliche Förderung.

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. W. Zillig, der mir in großzügiger Weise Zellmaterial von schwefelabhängigen Archaeobakterien zur Verfügung stellte.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. G. Stöffler für die Bereitstellung von Antisera gegen ribosomale Proteine von *E. coli*.

Frau Karin Schmidt und Frau Claudia Häutle danke ich für die sorgfältige Assistenz bei zahlreichen Versuchen.

Frau Margit Geier danke ich herzlich für die Reinschrift dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 26. September 1954 wurde ich, Gerhard Schmid, als Sohn der Damenschneiderin Edeltraud Schmid in München geboren.

In Thanstein, Landkreis Schwandorf, besuchte ich von 1960 bis 1965 die Volksschule. Im Herbst 1965 wechselte ich an das Ortenburg Gymnasium Oberviechtach und erhielt an dieser Schule 1974 das Reifezeugnis.

Zum Wintersemester 1975/1976 begann ich nach Ableistung des Grundwehrdienstes an der Universität Regensburg das Fach Biologie (Diplom) zu studieren. In diesem Fach legte ich 1977 die Diplomvorprüfung und 1979 die theoretische Diplomprüfung ab.

Am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg fertigte ich die Diplomarbeit im Jahre 1979/80 an.

Im August 1980 begann ich unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Böck mit der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation.

